

République Algérienne Démocratique et populaire

Ministère d'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen-

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers

Département de Biologie

Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme

Master en biologie

Option : Biochimie appliquée

Présenté Par :

ELALAOUI MOULAY DRISS

Contribution à l'étude phytochimique et
l'évaluation de l'effet hémolytique d'extrait brut
hydroalcoolique des graines de *Nigella sativa* L.

Soutenue le: 12/06/2014.

Devant le jury composé de:

Mr Rahmoun Nadjib	M.C.B	Président	Université Tlemcen
Mme Benariba Nabila	M.C.B	Examinatrice	Université Tlemcen
Mr Azzi Rachid	M.C.B	Promoteur	Université Tlemcen



Année Universitaire : 2013 – 2014.

Dédicaces

A ma mère,

De votre affection, de votre sacrifice et de tous les efforts que vous avez déployés durant toute ma vie j'espère que ce travail soit l'expression de ma pleine gratitude et de mon profond respect.

A mon père.

A la mémoire de mes grands pères.

A mes tantes.

A mes grandes mères.

A mes frères et sœurs.

A mes amis.

Moulay Driss

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur Monsieur, AZZI Rachid, Maitre de conférences classe au département de biologie, faculté des sciences de la Nature et de la Vie et sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen) pour sa confiance, son soutien, son attention, ses bons conseils, ses qualités humaines. Pour tout cela, je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Je remercie les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, je vous en suis très reconnaissante et en espérant être à l'hauteur de votre confiance.

Que Dr. RAHMOUN Nadjib, Maitre de conférence classe B au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen) trouve ici l'expression de mes respectueuses gratitude et le témoignage de nos profonds remerciements pour avoir accepté de présider cette jury.

Je remercie également Dr. BENARIBA N., Maitre de conférence classe B au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen) je vous adresse mes sincères remerciements et de mon profond respect d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.

Je tiens à remercier Madame BOUCHERIT OTMANI Z., Professeur au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen) directrice du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité biologique, où j'ai réalisé ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au dirigeant et aux personnels du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité biologique pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail.

A tous mes amis, surtout NADJARI fatima et BENSALAH faiza en leur souhaitant une bonne continuation dans leurs travaux.

Résumé

Notre étude porte sur une plante médicinale (*Nigella sativa* L) très utilisée comme aliment (dans divers plats traditionnels), et comme médicament en thérapie traditionnelle dans diverses pathologies.

L'intérêt de notre étude est de contribuer à l'analyse phytochimique de différentes préparations et extraits de la plante, et d'évaluer l'effet toxique de l'extrait brut hydroalcoolique des graines de la nigelle sur des érythrocytes isolés du sang humain, incubés dans un milieu tampon PBS à pH 7.4, en présence des différentes concentrations d'extraits.

L'analyse phytochimique des graines de la nigelle (*N. sativa* L). a révélé la présence des alcaloïdes, des tannins, saponines et composés réducteurs.

Les résultats ont montré un effet hémolytique important d'extrait brut hydroalcoolique des graines de nigelle (*N. sativa* L), préparé par décoction.

Cet effet est hautement significative à une concentration initiale d'extrait à 100 mg/ml d'ordre de 88 % par rapport d'un témoin positif représenté par l'hémolyse totale.

Par contre, cet effet est non significative à des concentrations faibles (10, 25 et 50 mg/ml) avec un taux d'hémolyse enregistré d'ordre 1 %, 4 %, et 25 % respectivement.

Mots clés : *Nigella sativa* L., analyse phytochimique, effet hémolytique, cytotoxicité,

ملخص

تعتبر الحبة السوداء (السانوج) نبتة كثيرة الاستعمالات ، تستعمل كإحدى التوابل في مختلف الأطباق التقليدية وكدواء لمعالجة عديد الأمراض الشائعة في الجهة الجنوب غربية للجزائر

تكمن أهمية هذه الدراسة في مقارنة للتحليلات الكيميائية النباتية لمختلف مستخلصات النبتة مع تقييم تأثير سمومية مستحضر كحولي لبذور النبتة على كوريات الدم الحمراء المعزولة من الدم البشري المحتضنة في وسط عازل الفوسفات في درجة الحموضة 7.4 لمدة ساعة واحدة .

كشفت التحليل الكيميائي النباتي وجود الصابونين ، الغلوكيدات، العفص والسكريات المرجعة.

فيما أظهرت نتائج الفحص البيولوجي أن تأثير الانحلال هو أكثر أهمية لاستخراج السم من قبل النبتة وذلك بتركيز 100 ملغ/ملم مع قدرة امتصاص تقدر ب 1.13 مع ظهور تطورات ذات أهمية عالية عبر الزمن خاصة عند 30 و 60 دقيقة. في الناتج يمكن أن نحدد نسبة الانحلال ب 88 % بالنسبة للمستخلص الكحولي بتركيز 100 ملغ/ملم مقارنة بالتركيز الأخرى 1 ، 4 و 25 % ل 10، 25، 50 ملغ/ملم بالنسبة للانحلال الكلي.

كلمات البحث : الحبة السوداء، التحليل الكيميائي النباتي، تأثير الحالة للدم، السمومية.

Table des matières

Table des matières.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures.....	
Introduction.....	1

1ère partie : synthèse bibliographique

1. synthèse bibliographique	3
-----------------------------------	---

2ème partie : étude expérimentale

Matériel et Méthodes

I. Tests phytochimiques.....	
1. Matériel végétal.....	19
1.1. Les graines de la nigelle	19
2. Préparation des extraits	21
2.1. Extraction en milieu aqueux	21
2.1.1. Par macération.....	21
2.1.2. Par infusion.....	21
2.1.3 Par décoction.....	21
2.2. Décoction en présence des solvants	21
2.3. Calcul des rendements	24
3. Tests phytochimiques.....	24
3.1. Les composés azotés	25
3.2. Les composés polyphénoliques	25
3.3. Les composés terpéniques	26
3.4. Les composés réducteurs	27

II. Analyse biologique	
1. Préparation du phosphate buffered saline (PBS) à pH=7.4.....	29
2. Préparation de la suspension érythrocytaire.....	29
3. Préparation des extraits	29
4. L'effet hémolytique.....	29
III. Etude statistique	
<i>Résultats et interprétations</i>	
1. Tests phytochimique	31
1.1. Rendement d'extraction.....	31
1.2. Screening phytochimiques.....	31
2. Analyse biologique.....	32
2.1. L'évolution de l'effet hémolytique de la plante étudié.....	32
Discussion	36
Conclusion	40
Références bibliographiques	41
Annexe	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des composés phénoliques.....	8
Tableau 2 : Compositions chimiques des graines de <i>Nigella sativa</i>	16
Tableau 3 : Compositions chimiques de l'huile fixe de <i>Nigella sativa</i>	16
Tableau 4 : situation géographique des stations de récolte.....	19
Tableau 5 : Les rendements d'extractions des graines de Nigelle (<i>N. sativa</i>) dans différents solvants.....	31
Tableau 6 : Résultats des tests phytochimiques des différentes préparations des graines de <i>N. sativa</i>	32

Liste des figures

Figure 1: Relation biogénétiques entre les principales classes des métabolites secondaires sources des principes actifs.....	10
Figure 2: morphologies et aspects botaniques de différentes parties de nigelle cultivée.....	15
Figure 3: essentiels constituants des graines de la nigelle <i>N.sativa</i>	17
Figure 4 : région de récolte.....	20
Figure 5 : matériel végétal graines de nigelle seul et dans le fruit.....	21
Figure 6 : diagramme montrant les différentes préparations des extraits.....	22
Figure 07: filtration de mélange.....	23
Figure 08: Rotavapor (Büchi Rotavapor R-200).....	23
Figure 09 : L'évolution de l'absorbance (taux d'hémolyse) en fonction du temps des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence de différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de <i>N. sativa</i> incubé à 37 °C	31
Figure 10 : L'évolution de taux d'hémolyse (par absorbance) dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de <i>N. sativa</i> incubé à 37 °C durant 1 heure à 548nm.....	32
Figure 11 : Evolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique des graines de la nigelle (<i>N. sativa</i>) après une heure d'incubation par rapport à l'hémolyse totale	33

Introduction

Synthèse Bibliographie

Au cours des siècles, la notion de médicament s'est dégagée peu à peu de la notion plus vaste de drogue active. Les anciennes pharmacopées nous livrent des listes hétéroclites des drogues empruntées aux trois règnes: minéral, végétal et animal. Les progrès de la chimie organique ont fait naître une catégorie d'actifs entièrement nouvelle formant une sorte de quatrième règne : les substances de synthèse. Cette évolution se retrouve dans celle de la définition du médicament : drogue autrefois, substance aux propriétés thérapeutiques.

La nature est pleine de ressources aux vertus bénéfiques pour l'homme. En plus de son alimentation, il y trouve des substances actives qui procurent un bienfait à son organisme.

L'humanité n'a pas attendu la seconde moitié du 20^e siècle pour se soigner. Depuis des millénaires, tous les peuples ont élaboré des médecines selon leur intelligence, leur génie, leur conception culturelle de la santé et de la maladie et les rapports qu'ils entretenaient avec leur environnement. L'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une pratique aussi vieille que l'histoire de l'humanité. D'après les données archéologiques et anthropologiques, cette pratique remontait à l'âge paléolithique moyen il y a quelque soixante mille ans. L'Homme, poussé par sa curiosité, fut tenté de goûter à tout ce qui lui tombait sous la main, s'exposant ainsi à de cuisantes confrontations aux immenses pouvoirs de créatures végétales apparemment inoffensives [Eddouks *et al.*, 2007].

Au fil des siècles, apprenant à distinguer le comestible du mortel, à se servir des substances toxiques aux dépens de leurs ennemis, à reconnaître les vertus curatives cachées dans leur environnement naturel, nos ancêtres nous ont légué une longue chaîne de savoirs traditionnels dont l'ensemble constitue la médecine traditionnelle actuelle [Eddouks *et al.*, 2007].

L'échec des traitements pharmaceutiques conventionnels, surtout dans le cas des maladies chroniques, la forte incidence des effets indésirables qui leur sont associés et l'insuffisance des infrastructures sanitaires dans les pays en voie de développement font qu'une large tranche de la population mondiale dépend essentiellement de la médecine naturelle, complémentaire ou parallèle pour se soigner [Bouixid, 2012].

La médecine traditionnelle est la somme de toutes les connaissances, démarches, compétences, englobe diverses pratiques reposant sur les théories, l'expression « médecine traditionnelle » se rapporte aux méthodes, savoirs, croyances et expériences propres à différentes cultures [OMS, 2013], en matière de santé qui impliquent l'usage à des fins médicales de plantes, animaux et/ou minéraux, les

thérapies spirituelles, les techniques manuelles et exercices, appliqués individuellement ou combinés, séparément ou en association [OMS, 2002], qu'elles soient explicables ou non, et qui sont utilisées dans la préservation de la santé, ainsi que dans la prévention, le diagnostic, l'amélioration ou le traitement de maladies physiques ou mentales en particulier les maladies chroniques[OMS, 2013].

Depuis 1978, l'OMS a pris des dispositions pour une évaluation approfondie de l'efficacité des ressources de la médecine traditionnelle afin de faire face aux problèmes de santé de la majorité des populations des pays en voie de développement [OMS, 1978].

La stratégie de l'OMS (2002-2005) s'est résolument engagée à la valorisation de pharmacopée traditionnelle afin de pouvoir satisfaire aux besoins de santé des populations. Dans cette optique la sécurité d'utilisation doit être le critère primordial du choix des plantes médicinales [OMS, 2002].

Dans de nombreuses régions du monde, les autorités, les professionnels de santé et la population se débattent avec des problèmes relatifs à la sécurité, à l'efficacité, à la qualité, à la disponibilité, à la préservation et à la réglementation de la médecine traditionnelle et complémentaire [OMS, 2013].

Selon les estimations de l'Organisation mondiale de la sante (OMS), de 60 % à 80 % de population ont recours aux traitements traditionnels pour satisfaire leurs besoins en matière de santé et de soins primaires [Farnsworth *et al.*,1985 et Akererele, 1990].

Les populations d'Afrique, Asie et Amérique latine utilisent la médecine traditionnelle pour les aider à satisfaire leurs besoins en matière de soins de santé primaires. En plus d'être accessible et abordable, Cette médecine est la plus accessible en termes économiques, géographiques et culturels. Il appartient souvent à un plus grand système de croyance et est considérée comme faisant partie intégrante de la vie de tous les jours et du bien-être [OMS, 2002].

Au monde actuel, on observe différents statuts juridiques pour les produits à base de plantes. Selon leur utilisation, ils peuvent être enregistrés comme :

- des aliments (fruits, légumes, tisanes, épices et aromates) ;
- des compléments alimentaires ;
- des médicaments ;
- des cosmétiques [Clément, 2003].

Les plantes (entières ou parties) ayant une activité thérapeutique reconnue, sont inscrites à la Pharmacopée (registre officiel précisant la définition et le contrôle des matières premières utilisées à des fins thérapeutiques). Certaines plantes citées en pharmacopée sont utilisées en :

- phytothérapie (plantes entières ou parties de plantes, ex. tisanes),
- aromathérapie (huiles essentielles ou essences),
- gemmothérapie (bourgeons),
- homéopathie (la plupart des médicaments homéopathiques),
- allopathie (présence d'extraits végétaux dans certaines spécialités, molécules actives extraites de plantes...) [Benayache, 2005].

La phytothérapie est le traitement par des plantes dont une ou plusieurs parties contiennent des substances agissant sur une ou plusieurs pathologies ou sur un ou plusieurs symptômes, les préparations sont à base de plantes ou d'extraits naturels à des doses pondérales. [Goetz, 2013]

Deux tendances se dégagent en phytothérapie : l'une s'appuie à la fois sur des connaissances empiriques issues de l'usage « traditionnel » des plantes, sensible à l'ethnobotanique et à la relation avec le malade, l'autre sur des éléments scientifique à plus récemment caractérisés, au raisonnement mathématique et ses méthodologies : essais cliniques, méta-analyses et statistiques... Entre ces pratiques, la fosse se creuse. La dualité tradition versus science, naturel/ synthétique, subjectif/objectif s'intensifie, ces deux sources de connaissances sont complémentaires ; les technologies modernes permettent de mieux comprendre le mode d'action des plantes et de leurs actifs et ainsi de proposer un usage thérapeutique documenté. [Guilbot *et al.*, 2013] . Avec l'argent et la médiatisation, une phytothérapie plus commerciale est apparue, soutenue par la créativité marketing [Bureau, 2008].

On peut distinguer clairement deux catégories de médicaments issus du règne végétal. Tout d'abord, les médicaments ne contenant qu'une entité chimique définie, qui sont utilisés dans le traitement de pathologies majeures et d'autres issus d'un usage traditionnel, qui contiennent des plantes entières ou leurs extraits, recelant de nombreuses molécules. Ceux-ci disposent d'une réglementation spécifique et sont disponibles sans ordonnance. Ces médicaments traditionnels, toujours présents sur le marché, nous rappellent que parfois une seule molécule ne peut être active, mais que c'est alors l'ensemble des constituants associés qui dispose de propriétés thérapeutiques, découvertes naguère [Clément, 2003].

L'approche ethnopharmacologique, qui vise l'évaluation scientifique de l'ensemble des pratiques traditionnelles relatives à la médication par les plantes et les substances

d'origine naturelle et la mise en évidence de leurs propriétés curatives, constitue la principale voie de découverte de nouvelles molécules candidates à servir de médicaments [Fabricant, 2001]. Les plantes sont reconnues comme une merveilleuse source de médicaments. Des milliers des espèces de plantes sont utilisées comme médicaments dans la thérapeutique traditionnelle. Ainsi, sur 252 médicaments considérés comme essentiels par l'OMS, plus de 11 % sont exclusivement produits à partir de plantes médicinales [Rates, 2001]. Malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne, les plantes médicinales trouvent encore leurs indications thérapeutiques dans le traitement d'une multitude d'affections et de maladies dans les différentes sociétés et cultures, y compris dans les pays développées [Eisenberg *et al.*, 1993 et De Smet, 2002].

Une grande proportion des populations africaines dans les pays en développement a recours aux connaissances ancestrales sur les plantes médicinales pour les besoins de santé [Adjanooun, 1986].

Bien que la connaissance et l'usage des plantes en Afrique, relèvent pour une large part d'un savoir mystique et sacré, la pratique médicinale traditionnelle incontournable, est de plus en plus l'objet de politiques de revalorisation [Philippe *et al.*, 2001 et Tsakala *et al.*, 2001].

La médecine traditionnelle et plus particulièrement les traitements à base de plantes étaient bien développés et beaucoup plus intéressante en Algérie pour plusieurs raisons [Rebbas *et al.*, 2012] :

- La richesse de la flore médicinale,
- La persistance de l'usage des plantes par une proportion importante de la population particulièrement rurale.

L'Algérie comme pays de nord d'Afrique, par son climat (méditerranéen, semi-aride) et par la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche et variée en plantes médicinales et alimentaires dont la plupart existent à l'état spontané [Veesenmeyer *et al.*, 2009], traditionnellement utilisées pour traiter plusieurs maladies, dont le diabète, les maladies cardiovasculaires, les pathologies de système digestive et autres pathologies [Kambouche *et al.*, 2011].

La flore algérienne regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques [Gonzalez-Tejero *et al.*, 2008, Graham *et al.*, 2000].

La maîtrise totale et parfaite des différentes propriétés de ces plantes, qui passe par la détermination de l'ensemble des groupes physicochimiques capables d'engendrer un ou plusieurs effets pharmacologiques. [Abdelwahed *et al.*, 2007].

Cependant, cette source semble inépuisable, puisque seule une petite partie des 250000 espèces végétales connues a été investiguée sur les plans phytochimiques et pharmacologiques et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents [Marin *et al.*, 2002].

La vie humaine sur terre est étroitement liée à l'exploitation des plantes. Ces dernières ont la capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. A côté des métabolites primaires, elles accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisable par l'homme en particulier illustrés dans le domaine thérapeutique [Marouf et Joël, 2007].

Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs et ils sont reconnus comme des signaux chimiques permettant à la plantes de s'adapter à l'environnement [Graglia *et al.*, 2001].

Les études actuelles portant sur les métabolites secondaires s'attachent bien évidemment à explorer surtout leurs activités pharmacologiques [Cai *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2008].

Ces composés sont synthétisés dans les différentes parties de la plante (racines, tige, feuilles...). Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont métabolisées, ces substances sont extrêmement complexes du point de vue structure et composition chimique. Toutefois, leur métabolisme produit des milliers de constituants différents, dont quelques-uns seulement sont responsables de l'effet thérapeutique [Hogan et Kolter, 2002].

Les métabolites secondaires dépassant actuellement 200000 substances identifiées appartiennent à trois grandes classes : les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine, [Bruneton, 1993 ; Guignard, 1996 ; Vermerris *et al.*, 2006].

Les composés phénoliques dérivés des glucides ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Tableau 1), et qui se différencient par la complexité du squelette, le degré de modifications de ce squelette et par les liaisons avec d'autres molécules [Harborne *et al.*, 1998]. Plusieurs milliers des composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à présent ;

Tableau 1 : Classification des composés phénoliques [Vermerris *et al.*, 2006 et Hennebelle, 2006].

Structure	Classe	Structure	Classe
C6	Phénols simples	C30	Biflavonyls
C6-C1	Acide phénolique	C6.C10.C14	Quinones
C6-C2	Acétophénone, A.phenylacetique	C18	Betacyanines
C6-C3	A.cinnamique,coumarine cinnamyl aldehydes	Lignans Neolignans	Dimères ou oligomères
C15	Flavonoïdes, isoflavonoïde flavanes,flavones,Chalcone anthocyanes,.....	Tannins, Lignin, Phlobaphenes	Oligomères ou polymères

Les acides phénoliques libres appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques, dérivés de l'acide benzoïque et les acides hydroxycinnamiques [Vermerris *et al.*, 2006].

Les tannins composés polyphénoliques, des unités monomériques répétitives qui varient par leur centre symétrique et degré d'oxydation, solubles dans l'eau, capables des précipiter les alcaloïdes, la gélatine est autres protéines.Ils sont divisé en deux groupes : les tannins condensés et les tannins hydrolysables dont les tannins galliques et ellagiques [Khanbabae et Van Ree, 2001].

Les flavonoïdes dérivent des flavanes composent un groupes de plus de 6000 composés naturels qui constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de déférent organes végétaux [Havsteen, 2002].

Les quinones sont des pigments naturels, la plus part sont jaunes pales, rouges et bruns. Ces couleurs sont masquées par les autres pigments, ils assurent des fonctions biologiques importants tell que le transfert des électrons dans la mitochondrie et chloroplastes [Harborne, 1998].

D'autre part, les composés terpénique, les stéroïdes et terpénoïdes : isoprénoïdes dérivés des lipides constituent le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux, formées par l'assemblage d'un nombre entier

pentacarbonées, chaque groupe de terpènes est issu de la condensation d'un nombre variable d'unités isopréniques dont ils classés. [Bruneton, 1999].

Enfin, les composés azotés dérivés des acides aminés dont les alcaloïdes ; ce groupe contient 10000 composés classé selon leurs hétérocycles [Amrit, 2002]. Les alcaloïdes composés azotés basiques, sont des substances organiques d'origine naturelle, le plus souvent végétales, ont une structure complexe, leur atome d'azote est inclus dans l'hétérocycle, existent sous la forme, soluble, de sels ou sous celle de combinaison avec les tannins [Bruneton, 1999].

Ces métabolites secondaires sont en majorité synthétisés par trois voies principales, fait des relations entre eux et celle des métabolites primaires (figure 1).

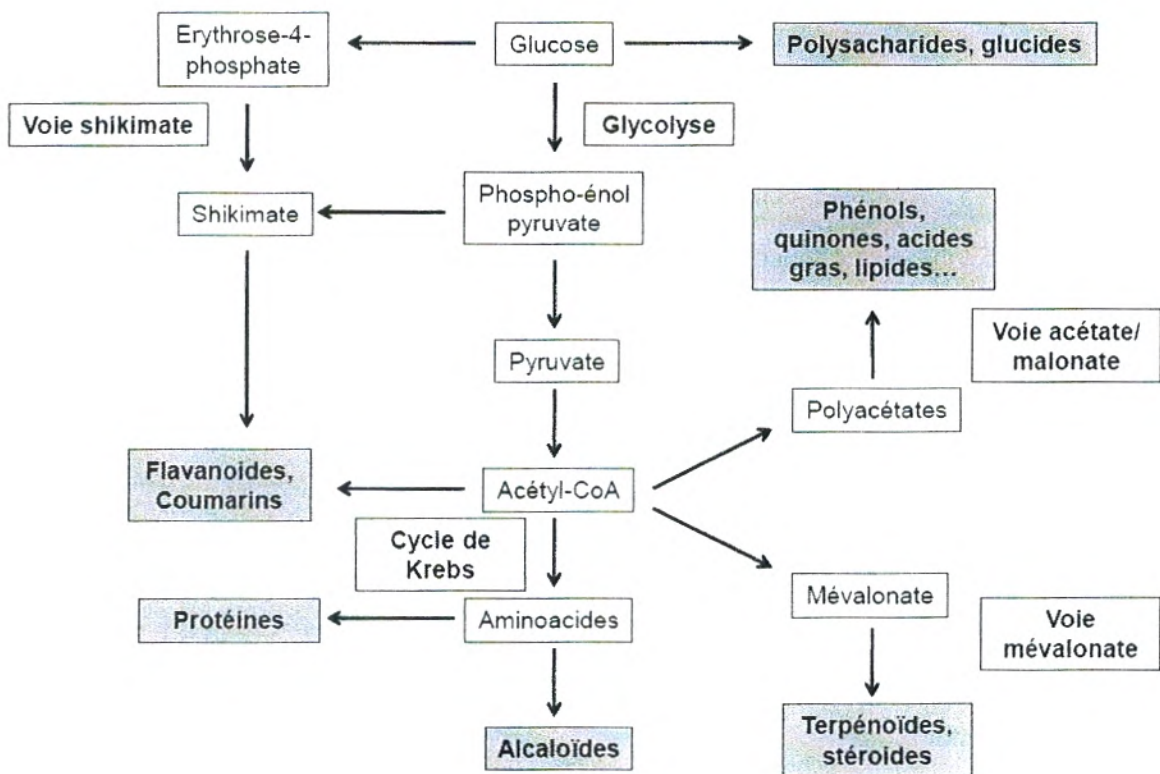


Figure 1: Relation biogénétiques entre les principales classes des métabolites secondaires sources des principes actifs [Ramawat *et al.*, 2009].

Toute substance biologiquement active est susceptible, à fortes doses ou à faibles doses et pour une administration prolongée de produire des effets toxiques [Ouedraogo *et al.*, 2001].

Beaucoup des plantes médicinales et de médicaments sont thérapeutiques à une certaine dose et toxiques à une autre. Tout dépend des composition de ces plantes, c'est le cas particulier des produits végétaux riches en saponosides, de terpènes, alcaloïdes, et en générale d'autres substances chimiques [Trevoux *et al.*, 2000 , Saad *et al.*, 2006].

La toxicité est la capacité intrinsèque d'un agent chimique ou physique à avoir un effet nocif sur un organisme. C'est la particularité propre à diverses substances dont l'absorption des doses uniques ou répétées a pour effet de perturber le métabolisme des êtres vivants, provoquant des troubles physiologiques pouvant aller jusqu'à la mort des individus exposés [Ramade, 2002].

La toxicité d'une substance au niveau de l'organisme dépend de la nature de la substance, de la dose et de la durée d'exposition, des différents facteurs liés à l'individu (sexe, âge, état nutritionnel et hormonal), des facteurs environnementaux et de l'exposition simultanée ou antérieure à d'autres produits chimiques. Les facteurs propres à chaque individu peuvent modifier l'absorption, la distribution, l'excrétion, les transformations métaboliques et la sensibilité du récepteur dans l'organe cible [Tron *et al.*, 2002].

Les toxines interviennent au niveau des sites cellulaires et agissent sur des cibles moléculaires dont la nature chimique est variable à savoir: les protéines de structure (membranes), les enzymes, les transporteurs comme l'hémoglobine, les coenzymes, les lipides, les acides nucléiques et les sucres ; Ces derniers étant en revanche rarement affectés par les molécules toxiques. Ainsi, les effets spécifiques des toxines résultent de la présence de récepteurs qui interviennent dans leurs mécanismes d'action [Tron *et al.*, 2002].

De ce fait, les tests de toxicité permettent d'évaluer les risques liés à l'exposition à une substance chimique particulière, et l'obtention des informations sur les caractéristiques de cette substance [Diezi, 1992].

La classification des toxines est donc abordée de plusieurs points de vue. Elle dépend souvent du domaine d'application, de l'objectif poursuivi par un organisme ou même du champ d'activité d'un individu.

Les effets toxiques peuvent être classés de diverses façons, selon, par exemple :

- la durée : aiguë, chronique ;
- le type d'action : locale, systémique ;
- le mécanisme d'action : stimulant, inhibiteur ;
- la voie de pénétration : respiratoire, cutanée, digestive ;
- le tissu ou l'organe affecté : sang (hématotoxique), foie (hépatotoxique), rein (néphrotoxique), le système nerveux (neurotoxique) ;

- la nature de l'effet : irritant, sensibilisant, asphyxiant, cancérogène ;
- l'utilisation : pesticides, savons, solvants ; [Ababsa, 2009].

La pharmacologie reconnaît l'action bénéfique de certaines plantes et s'attache donc à extraire le principe actif. La consommation « brute » de la plante induit la consommation d'autres produits contenus dans la plante que le principe actif, ne permettant ainsi pas de connaître la dose exacte de principe actif ingéré entraînant un risque de sous-dosage ou de surdosage. Pour certains médecins phytothérapeutes, les autres principes vont atténuer les effets secondaires en entrant en interaction.

Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont utilisées, les plantes sont extrêmement complexes du point de vue de leur composition chimique. On estime qu'elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents, dont quelques uns seulement (ou parfois un seul) sont responsables de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique [Hostettmann *et al.*, 1998]. Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes médicinales afin d'étudier leur efficacité, leur mode d'action et bien entendu leurs effets secondaires sur la santé humaine.

La toxicité des plantes médicinales peut être liée à des mélanges de composés actifs qu'elles contiennent, leurs interactions avec d'autres herbes, les médicaments et les contaminants.

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives et quantitatives. En fonction de la durée de l'étude et de la dose administrée, plusieurs types de toxicité sont distingués: la toxicité aiguë, la toxicité subaiguë et la toxicité chronique.

Une façon pratique de caractériser la toxicité d'une substance consiste à déterminer sa dose létale 50 (DL50). Cette dose permet d'identifier les symptômes de l'intoxication et de comparer les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. Elle sert souvent de point de départ des études de toxicité, car elle fournit un minimum de connaissances [Ababsa, 2009].

L'indice DL 50 sert fréquemment pour exprimer la toxicité aiguë ainsi que pour classer et comparer les toxiques. Il a cependant une valeur très limitée, car il ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes en jeu et la nature des lésions. Il s'agit d'une appréciation grossière et préliminaire (première analyse) qui peut être influencée par plusieurs facteurs tels l'espèce animale, le sexe, l'âge, le moment de la journée,etc [Ababsa, 2009].

La toxicité aiguë est l'étude qualitative et quantitative de l'altération irréversible des fonctions vitales après administration unique d'une substance dans un délai de quelques minutes à quatorze jours. C'est le premier test qu'un toxicologue effectue sur un nouveau composé destiné à être utilisé comme médicament. Les résultats de ces tests fournissent les premiers indices vis à vis de la toxicité d'une substance. Elle s'évalue en déterminant la dose létale 50 (DL50) c'est-à-dire, la dose unique qui provoque dans un délai de 14 jours, la mort de 50 % des animaux traités. Cette étude devrait être effectuée sur deux à trois espèces animales pour une bonne étude de la variabilité physiologique [Agbor *et al.*, 2005].

La toxicité subaiguë (ou subchronique) peut se définir comme la toxicité provoquée chez des animaux expérimentaux par une exposition répétée à l'agent toxique durant une période pouvant atteindre environ un dixième de la durée de vie moyenne de l'espèce en question (soit 90 jours environ chez le rat). Schématiquement, plusieurs groupes d'animaux des deux sexes sont exposés à différentes doses de la substance durant la période choisie. Un groupe contrôle formé du nombre d'animaux requis par sexe doit aussi être constitué. L'utilisation des deux sexes est importante pour rendre compte de l'influence éventuelle des hormones sexuelles sur la réponse. Au moment du sacrifice des animaux, différentes mesures doivent être effectuées notamment les mesures de chimie clinique (analyses du plasma, du sérum, des urines, etc.), d'hématologie ainsi qu'une autopsie et un examen histopathologique de certains tissus et organes. Ces études de toxicité subaiguë permettent de reconnaître les principaux sites et éventuellement les mécanismes d'action du toxique ainsi que de déterminer la dose ne produisant pas d'effets toxiques [Diezi, 1989].

La toxicité chronique est déterminée après administration de doses répétées d'une substance à l'animal pendant une période s'étendant sur une grande partie de sa vie, voire sur plusieurs générations [Cheftel *et al.*, 1989].

La toxicité est une notion relative et varie en fonction de la partie de la plante étant extraite ou mangée et les quantités prises, (dont l'effet toxique des plantes médicinales varie selon leurs effets pharmacologiques). Cependant, il est essentiel que les composés de l'extrait brut soient testés pour leur toxicité, bien que la plupart des tests ne mesurent actuellement que la toxicité aiguë. Ces tests ne fournissent pas d'informations sur les réactions indésirables qui pourraient résulter de l'exposition à long terme de ces espèces [Soumyanath, 2006].

Plusieurs produits à base de plantes médicinales autrefois utilisés ont été déclarés toxiques à la suite d'études toxicologiques et leurs doses ont été modifiées afin de diminuer leur toxicité [Agbor et Ngogang, 2005].

De ce fait, le globule rouge a été choisi comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire, en vue de sa facilité d'isolement, sa relative simplicité, de plus la membrane érythrocytaire est un outil précieux pour l'étude des transports ioniques transmembranaires et la présence de cette système de transport similaires à ceux dans certains tissu justifier cette choix [Wajeman *et al.*, 1992].

L'érythrocyte ou l'hématie est une cellule sanguine responsable de transfert des gaz, sa forme de disque biconcave lui permet d'offrir une surface d'échange maximale [Schved *et al.*, 2004].

Particularités du globule rouge est l'absence de noyau implique 3 notions :

- Incapacité du système protéique (il n'existe pas d'ADN ni d'ARN)
- Donc un stock enzymatique et énergétique limité et prédéterminé.
- L'usure progressive et la disparition des constituants non renouvelables.

Le métabolisme énergétique du GR a pour rôle de :

- Maintenir en activité un système réducteur puissant NADH-NADPH. En effet ce système est nécessaire pour que l'Hb soit protégé contre l'oxydation de ses constituants (fer et globine). Dans ce système le NADH est fourni par la voie principale de la glycolyse et le NADPH est fourni exclusivement par la voie accessoire.
- Produire l'ATP : celui-ci est nécessaire au bon fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ et par conséquent à l'équilibre osmotique du GR (lutte contre l'hyperhydratation). Il est fourni par la glycolyse essentiellement assurée par la voie principale.

L'hémolyse physiologique est la destruction du globule rouge après une vie de 120j, elle doit être différenciée de l'hémolyse pathologique ou hyper hémolyse liée à la modification de 3 facteurs vitaux pour le GR :

- ✓ La membrane érythrocytaire.
- ✓ Le métabolisme énergétique : enzymes.
- ✓ Le contenu hémoglobinique.

La lyse des globules rouges peut être simplement réalisée en plaçant des hématies dans une solution hypotonique (hémolyse osmotique) ou L'érythrocyte passe de sa forme de disque biconcave à une forme sphérique allongée caractérisée par le passage des ions K^+ vers le milieu extracellulaire et les ions Na^+ passent dans le milieu intracellulaire, par conséquence la membrane cellulaire est brisés, aboutissant à la libération du contenu dans le milieu extracellulaire [Seemant, 1974].

Notre plante : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae), communément appelée nigelle cultivée, est une plante annuelle traditionnellement utilisée dans les pays arabes [Sayed 1980], dans le sous-continent indien et en Europe depuis des millénaires à des fins

culinaires et médicinales [Lautenbacher 1997]. En effet, l'utilisation de certaines plantes médicinales dans l'alimentation remonte à la plus haute antiquité, à des racines des premières civilisations humaines.

Le genre *Nigella* comporte 20 espèce ; *sativa* de sud d'Europe, Afrique de nord et sud-ouest d'Asie.

Selon une croyance communément admise chez les musulmans, «Habba sawda» (« la graine noire ») ainsi qu'elle est dénommée en arabe, est une panacée utilisée pour traiter tous les maux sauf pour prévenir la vieillesse ou la mort.

Situation botanique de l'espèce *Nigella sativa* [APG III 2009].

- Règne : végétale ;
- sous-règne : plante ;
- Embranchement: Spermaphytes ;
- sous-Embranchement : Angiosperme ;
- classe : Eudicots;
- ordre : Ranunculales ;
- famille : Ranunculacée ;
- genre : *Nigella* ;
- espèce : *sativa*.
- Nom binomiale : *Nigella sativa*.

Synonymes et dénominations internationales [Wichtl et Anton, 2003]

- Arabe : habba sawda, habbet el baraka, sinouj, sanouj, kammun aswad ;
- Français : cumin noir, nigelle des jardins, herbe aux épices, poivrete ;
- Anglais : black caraway, common fennel flower, garden nigelle ;
- Espagnol (castillan) : neguilla, sanuj, arañuela cultivada, barba d'ermità;
- Italien : nigella coltivata, grano nero, cominella, melantro coltivato .

La nigelle cultivée (*Nigella sativa* Linn.) est une plante annuelle herbacée, atteignant 20 à 60 cm de haut (figure 2). Les fruits murs contenant plusieurs graines, est une capsule formée de trois à six carpelles soudés, constitués de follicules 3-7 follicule, s'ouvrant par une fente interne, renferment de nombreuses graines de couleur blanchâtres, ovoïdes et qui deviennent noires mat en contact avec l'air [Ghedira, 2006], mesurant de 2 à 3,5 mm de long 2 - 3.5 mm * 1-2 mm, et présentant trois ou quatre angles. La face supérieure est finement granuleuse et réticulée [Goreja *et al.*, 2003; Warriar *et al.*, 2004].



Figure 2: morphologies et aspects botaniques de différentes parties de nigelle cultivée.

Ses graines ou l'huile qui en est issue constituent un large remède naturel à travers le monde, pour de nombreuses pathologies grâce aux constituants (tableau 2 et 3, figure 3), notamment pour le traitement de l'asthme [Gilani et al., 2004], de l'inflammation [Ghannadi, 2005, Chehl *et al.*, 2009 et Alemi *et al.*, 2012], de l'ulcère gastrique [Raj Kapoor *et al.*, 2002] et du diabète [Haddad *et al.*, 2003 et Salama., 2011], de la toux, de l'eczéma et des états grippaux. Le grand spectre d'application médicale de la nigelle trouve sa justification dans les propriétés curatives extraordinaires et prometteuses découvertes récemment comme antitumorales [Woo *et al.*, 2011 et Peng *et al.*, 2013], immunostimulantes et antioxydantes [Burits, 2000 et Bourgou *et al.*, 2012] ; et antifongique [Chaieb *et al.*, 2011 et Bitar *et al.*, 2012]. L'huile est employée comme diurétique, carminatif, cholagogue et vermifuge, et souligne l'intérêt socio-économique de la plante dans le domaine de la recherche biopharmacologique.

Tableau 2 : Composition chimique des graines de *Nigella sativa* (g/100 g d'AG total) [Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007 ; Gali-Muhtasib *et al.*, 2006 ; Warriar *et al.*, 2004]

Composées	Classes
Quinone	nigellone. Thymoquinone. Thymohydroquinone. dithymoquinone. p-cymene. 4-terpineol.....
Alcaloïdes	Nigellimine. nigellimine-N-oxyde. nigellidine. nigelline...
Triterpène et saponine	Alpha-hédérine.
Huiles	Fixe 30% : essentiel 1.5% au maximum.
Autre composés	Protéines. Sucre. acides gras. vitamines et minéraux.....

Tableau 3 : Composition chimique de l'huile fixe de *Nigella sativa* (g/100 g d'AG total) [Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007 ; Gali-Muhtasib *et al.*, 2006 ; Warriar *et al.*, 2004].

Acide gras	Teneur moyenne %
AG saturés	22,7–25,5
AG mono-insaturés	25,0–26,5
AG polyinsaturés	49,8–50,7
Myristique	0,35–0,41
Myristoléique	Traces
Palmitique	17,2–18,4
Palmitoléique	0,78–1,15
Margaroléique	Traces
Stéarique	2,84–3,69
Oléique	23,7–25
Linoléique	49–50,31
Linolénique	0,32–0,34
Béhénique	1,98–2,60
Arachidique	0,14–0,22

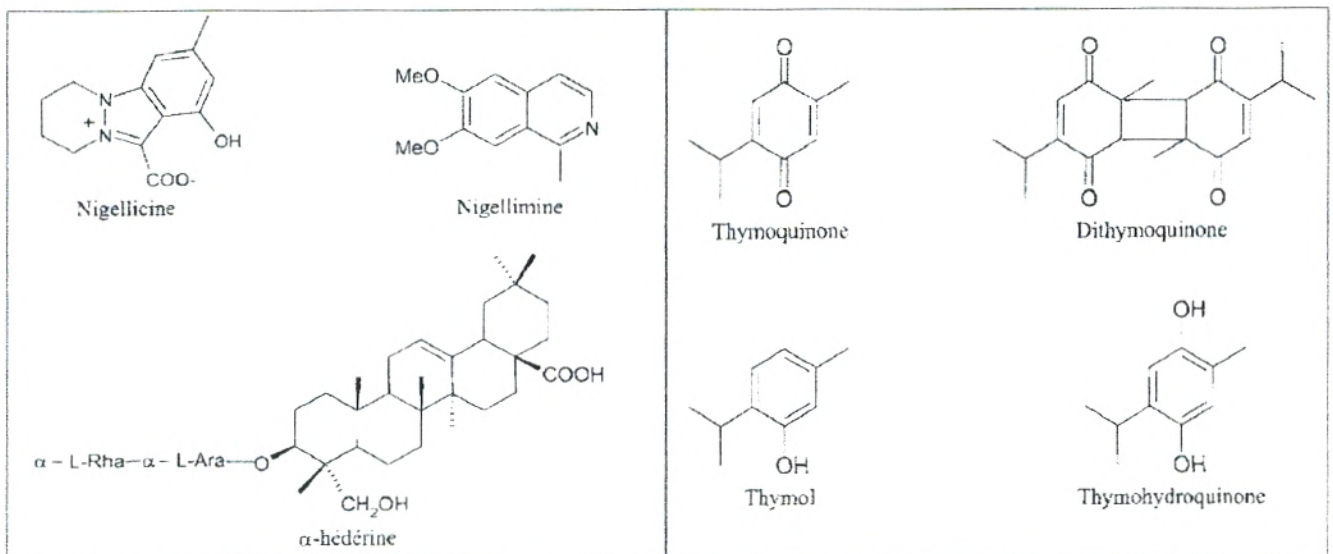


Figure 3: essentiels constituants des graines de la nigelle *N.sativa* [Ghedira, 2006].

Nous avons vu que *Nigella sativa* L., plante utilisée d'abord comme épice puis comme remède depuis plus de 2000 ans dans la culture orientale, a un large spectre d'activité, durant les vingt dernières années, plusieurs travaux ont porté sur l'étude de *Nigella*

sativa, notamment sur les effets dus aux extraits de la graine de cette espèce sur divers systèmes *in vivo* et *in vitro* entre eux la toxicité de la nigelle.

Bien que de nombreuses expérimentations aient rapporté un effet non toxique des graines de nigelle, une étude a montré que la consommation de graines de *N. sativa* sur une longue période serait néfaste pour la santé [Zaoui et al 2002].

L'administration d'extrait de graine de *N. sativa* à raison de 50 mg/kg par voie intrapéritonéale pendant cinq jours chez le rat entraîne une faible toxicité, notamment une faible incidence sur les activités d'enzymes et de métabolites reflétant les fonctions hépatique et rénale [El Daly., 1998]

L'administration par voie orale d'huile de graines à des doses allant jusqu'à 10 ml/kg chez le rat n'entraîne pas de mortalité durant une période d'observation de 48 heures. L'administration à fortes doses (2 g/kg de poids corporel) entraîne chez l'animal une hypoactivité et une difficulté respiratoire [Badarg *et al.*, 1998].

Une étude publiée en 2012 a confirmé l'effet toxique de l'huile végétale de *N. sativa*. Des doses journalières de 15 et 25 mL/kg de poids corporel ont été administrées à des rats par voie orale durant un mois. Des modifications au niveau des structures histologiques du cortex rénal et à un moindre degré au niveau de leurs cellules hépatiques ont été rapportées [Zaghlol *et al.*, 2012].

D'autre part, l'administration de l'extrait de *N. sativa* obtenu par l'hexane à des rates gestantes pendant les dix premiers jours de gestation à une dose de 2g/kg/jour, a inhibé le processus d'implantation. La nigelle serait abortive pendant les 10 premiers jours de grossesse, mais après l'effet n'a pas été observé [Toparslan 2012].

Comme la plupart des plantes et bien qu'elle ait des propriétés antiallergiques, *N. sativa* peut provoquer des allergies chez les personnes sensibles. Par la présence de thymoquinone, elle pourrait provoquer une dermatite de contact. Ses alcaloïdes, comme la nigellicine, nigellidine, nigellimine et nigellimine N-oxyde, pourraient provoquer des dermatites irritatives. Les consommateurs de nigelle doivent être avertis des éventuels effets néfastes que peut provoquer cette plante et ses constituants [Al-ali *et al.*, 2008].

En 2008, une réévaluation des DL50 de la thymoquinone a été réalisée sur des souris et des rats. Chez la souris, la DL50 de TQ après administration par voie intrapéritonéale a été de 104 mg/kg et de 870 mg/kg de poids corporel par voie orale. Les valeurs ont été de 57 mg/ kg et 794 mg/kg chez le rat après injection intra-péritonéale

et administration par voie orale respectivement. Les valeurs des DL50 obtenues après injection intra-péritonéale et administration *per os* sont respectivement 10 à 15 fois et 100 à 150 fois supérieures aux doses de thymoquinone nécessaires pour obtenir un effet anti-inflammatoire, antioxydant ou anticancéreux [Al-ali *et al.*, 2008].

Matériel et Méthodes

La découverte de ressources naturelles du monde végétal reste capitale par la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

Notre travail porte sur une étude phytochimique des différentes préparations des graines de *Nigella sativa L* ainsi une étude de la cytotoxicité *in vitro*, basé sur l'hémolyse des globules rouge, en présence de différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique des graines de *Nigella sativa L.*, préparé par décoction pendant une heure.

I. Tests phytochimiques :

1. Matériel végétal

1.1. Les graines de la nigelle

Les fruits de la nigelle (*Nigella sativa L.*); famille des Renunculacées; sont récoltés à maturité dans son habitat naturel dans la région de Timoktene (wilaya d'Adrar, Algérie), durant le mois d'Avril 2013, (tableau 4 ; figure 4).

La wilaya d'Adrar : localisée dans le Sud-ouest du pays. Elle est délimitée au Nord par les wilayas d'El Bayadh et de Ghardaïa, à l'Ouest par les wilayas de Béchar et Tindouf, à l'Est par la wilaya de Tamanrasset et au Sud par la Mauritanie et le Mali. [ONS Algérie, 2008].

Tableau 4 : situation géographique des stations de récolte [Encarta, 2009].

Région	Latitude	Longitude	Altitude	Etage bioclimatique
Timoktene	27 ° 00'	01° 01'	277 m	Aride

Le matériel végétal récolté est ensuite séché à l'abri de l'humidité et de la lumière. Une fois séchée, la matière végétale a été réduite en graines puis soumise à l'extraction pour des tests phytochimiques et biologiques (figure 5).

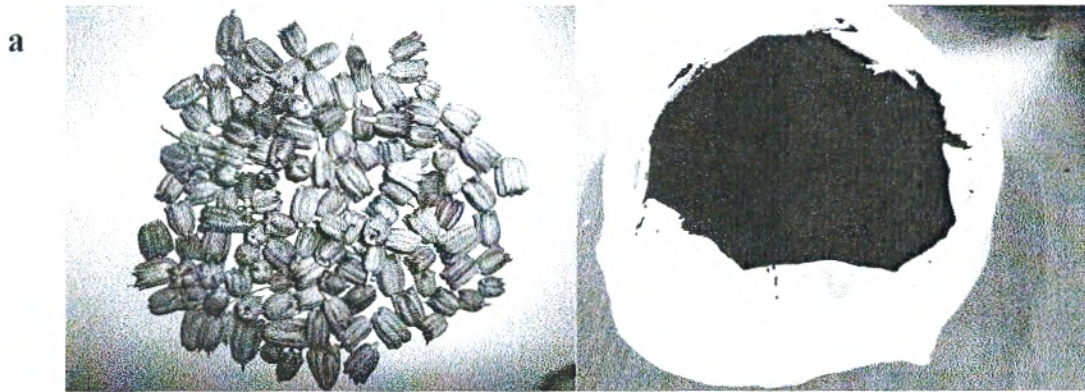


Figure 5 : matériel végétal a) fruit de nigelle b) graines de nigelle.

2. Préparation des extraits :

2.1 Extraction en milieu aqueux :

2.1.1 Macération :

Macération sous agitation, à une température ambiante et sous agitation, pendant 24 heures, de 10 g du matériel végétal dans 100 ml d'eau distillé ;

Filtrer le mélange et récupérer le filtrat (figure 6).

2.1.2 Infusion :

- Verser 100 ml d'eau distillée bouillante sur 5 g du matériel végétal ;
- Agiter et laisser le mélange refroidir ;
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat (figure 6).

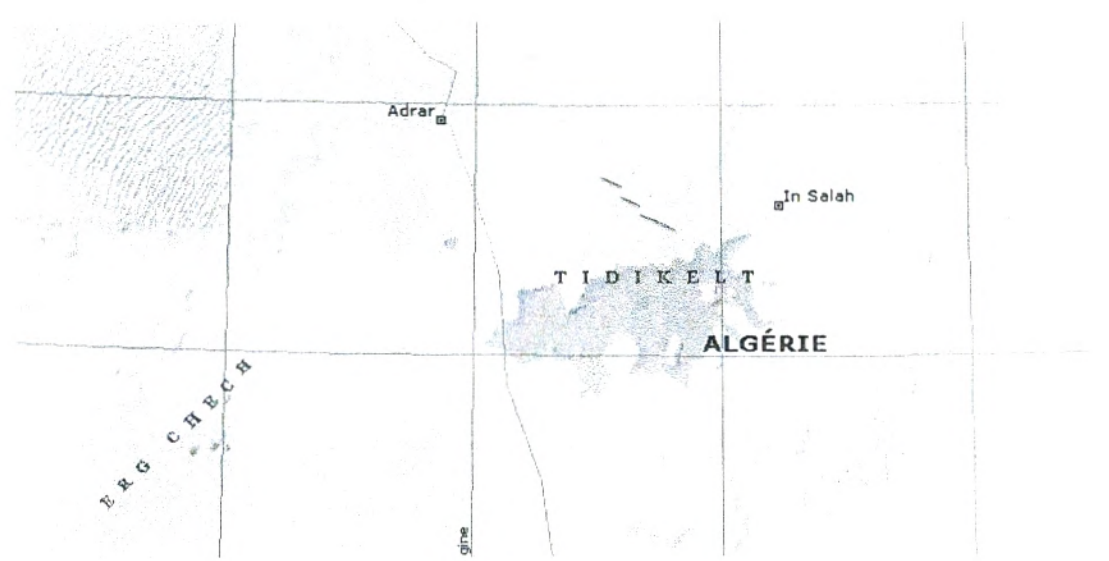
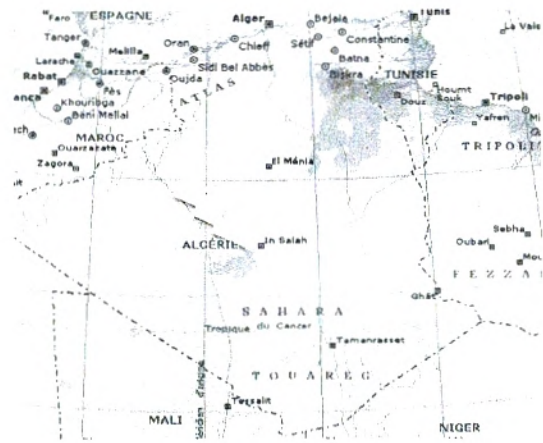
2.1.3 Décoction :

- Mélanger 10 g du matériel végétal avec 100 ml d'eau distillée dans un ballon rodé, surmonté d'un réfrigérant;
- Chauffer à une température d'ébullition stable, pendant 1 heure, à l'aide d'un chauffe ballon ;
- Filtrer le mélange et récupérer le filtrat (figure 6).

2.2. Décoction en présence des solvants :

2.2.1 extrait hydroalcoolique

10 g de la matière végétale, séché, est mise en contact avec le mélange méthanol/eau (70:30) (v/v) et est portée sous reflux pendant une heure (figure 6).



Légende de la carte :

- limite d'Etat.
- Agglomération
- Routes
- ~ Cours d'eau
- Cours d'eau non permanent

Station de récolte

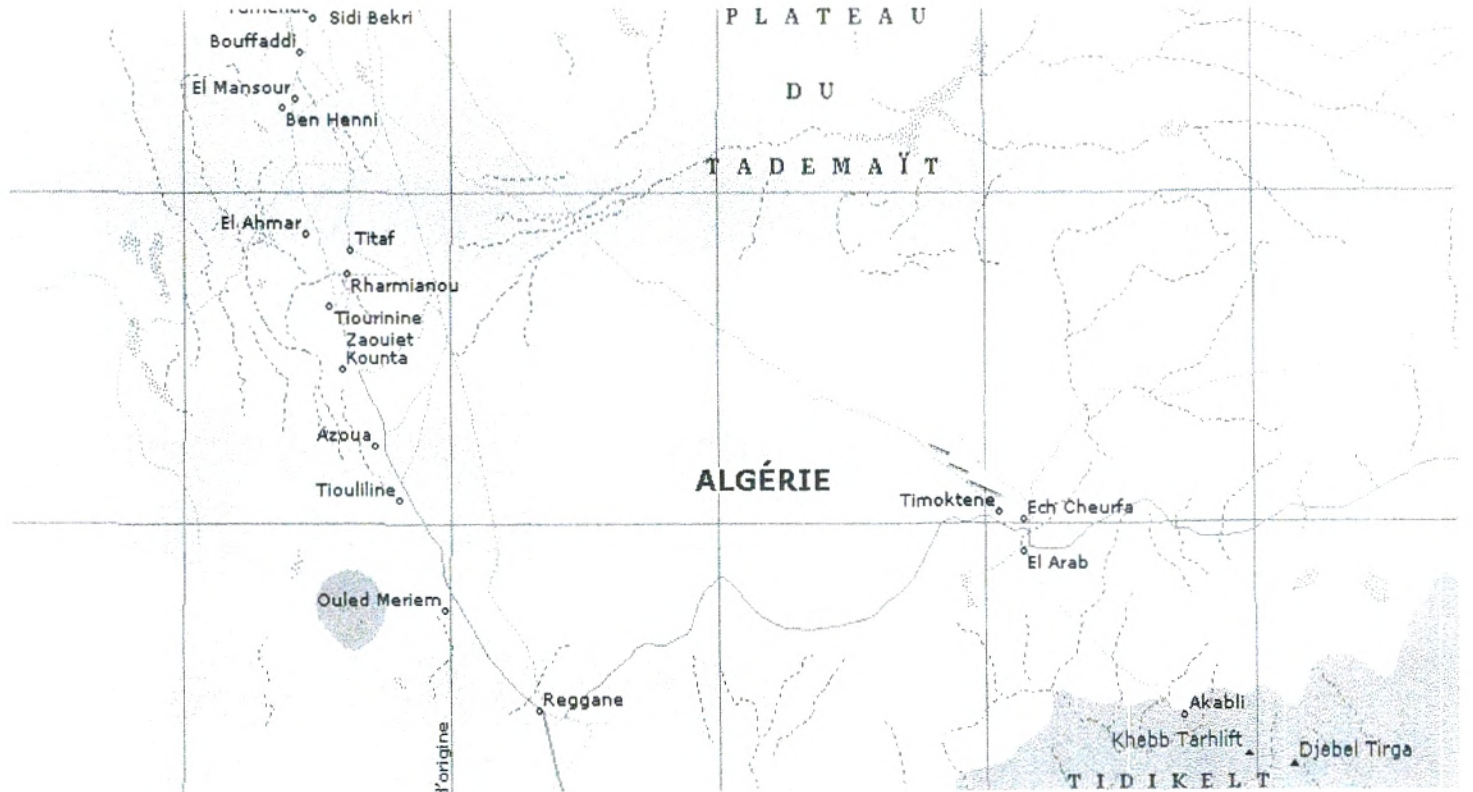


Figure 4 : région de récolte (Encarta, 2009).

Après une double filtration sur papier Whatman (figure 7), Les filtrats ont été soumis à une évaporation sous vide via un rotavapeur type Büchi Rotavapor R-200 à la température de 50°C (figure 8).

2.2.2 extrait étheré

Une autre extraction a été réalisée par la même méthode, mais avec un solvant apolaire qu'est l'éther de pétrole



Figure 07 : filtration de mélange.



Figure 08: Rotavapor (Büchi Rotavapor R-200).

2.3 Calcul les rendements des extraits :

Le rendement en pourcentage a été calculé par la formule :

$$R (\%) = (m / m_0) * 100$$

R (%) : rendement en pourcentage.

m : masse en gramme de l'extrait sec résultant.

m₀ : masse en gramme du matériel végétal à traiter.

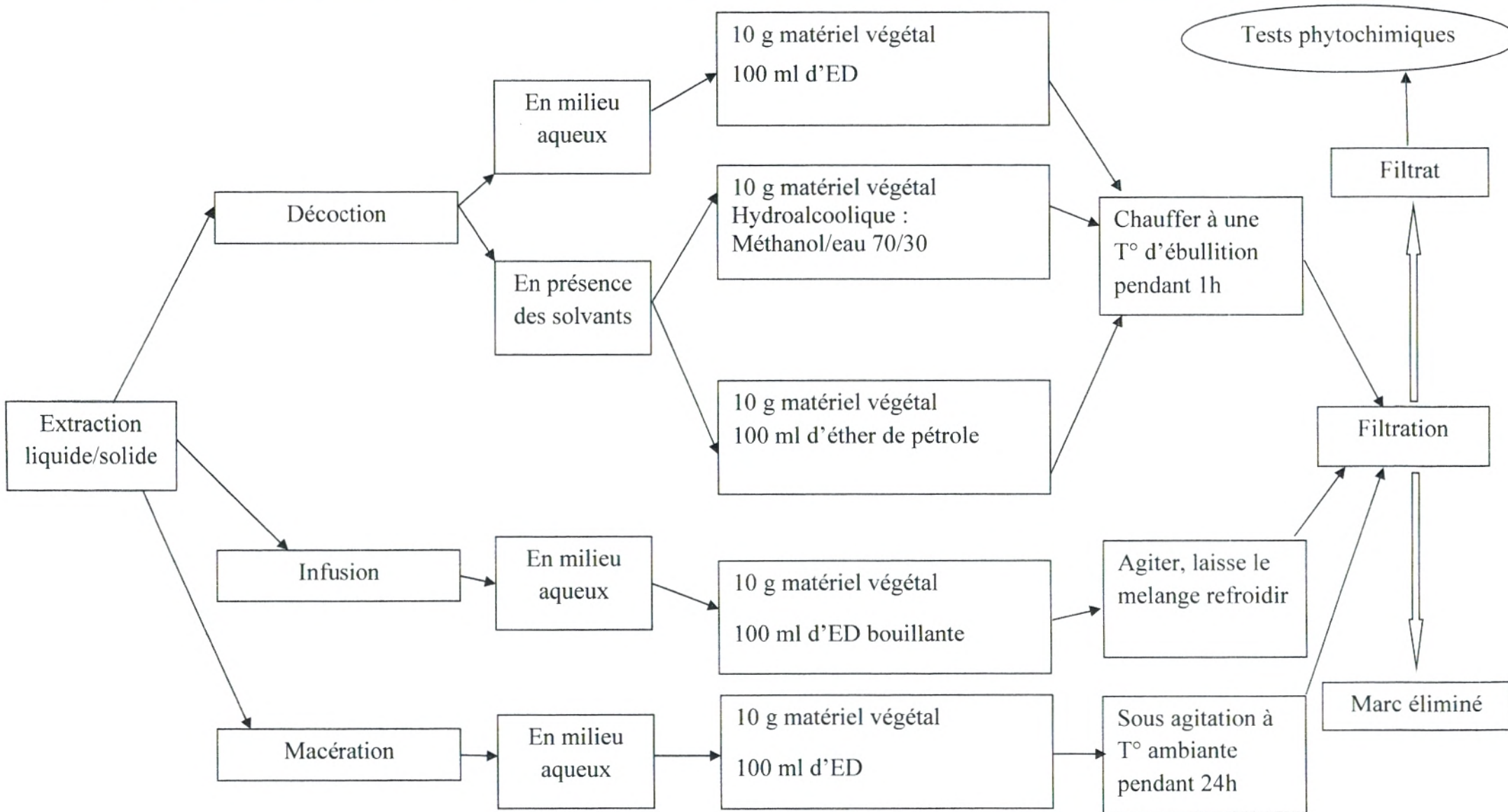


Figure 6 : diagramme montrant les différentes préparations des extraits des graines de la nigelle (*N. sativa*).

3. Tests phytochimiques:

On fait des tests phytochimique sur les différents extraits aqueux et l'extrait étheré seulement.

L'un des buts essentiels d'un test phytochimique consistent la détection des différentes familles de métabolites secondaires existants dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation.

Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés ainsi que des examen en lumière ultraviolette [Hagerman *et al.*, 2000].

Dans cette partie nous avons utilisé les techniques standards décrites par **Memelink et al., 2001 ; Bruneton, 1999, Harborne 1998 et Trease et Evans 1989.**

Les résultats sont évaluées comme suit : +++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif ; ND : non déterminé.

3.1 Les composés azotés : Les alcaloïdes

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer et Wagner.

Prendre 1 ml de l'extrait à analyser dans 2 tubes à essai. Acidifier le milieu par quelques gouttes d'acide chlorhydrique, ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube, 5 gouttes du réactif de Wagner dans le second tube, l'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes .

3.2 Les composés polyphénoliques :

3.2.1 Les tanins :

Dans un tube à essai, introduire 5 ml d'extrait à analyser et ajouter 1 ml de solution aqueuse de FeCl_3 à 1 %. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

3.2.2 Les Flavonoïdes :

A 5 ml d'extrait à tester, ajouter 1 ml d'alcool iso amylique, quelques copeaux de magnésium et quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl).

Les flavonoïdes donnent généralement avec le magnésium en présence d'acide chlorhydrique une coloration rose ou rouge.

3.2.3 Les coumarines : Fluorescence UV

Introduire 2 ml d'extrait dans un tube, ajouter 0,5 ml de NH_4OH à 25 %. Mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

3.3 Composés terpéniques : Stérols et triterpènes : La réaction de Liebermann Buchard.

Evaporer à sec 10 ml de la solution à analyser, dissoudre le résidu dans 5 ml d'anhydride acétique puis 5 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette ajouter 1 ml de H_2SO_4 concentré à la paroi du tube sans agiter. Laisser reposer 30 minutes. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes.

3.3.1 Les saponosides : Indice de mousse

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire respectivement 1, 2, 3, ..., 10 ml de la solution à analyser préparé par décoction ou par infusion et macération en milieu aqueux.

Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée.

Agiter chaque tube dans le sens de la longueur du tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. Laisser reposer 15 min et mesurer l' hauteur de la mousse produite dans chaque tube.

L'indice de mousse (**I**) est calculée par la formule suivante : $I = 1000 / N$

N est le numéro du tube où la hauteur de mousse est égale à 1 cm.

3.3.2 Anthraquinones libres: Réaction de Bornträger :

Introduire dans un tube à essais 1ml d'extrait chloroformique préparé, ajouter 1ml de NH_4OH dilué puis agiter, une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

3.4 Les composées réducteurs :

Introduire 2 ml d'extrait dans un tube, ajouter 2 ml de liqueur de Fehling (1ml réactif A et 1ml réactif B), incuber l'ensemble 8 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

II. Analyse biologique :

On fait l'analyse biologique d'extrait hydroalcoolique seulement.

Les testes de l'effet hémolytique de l'extrait hydroalcoolique de nigelle ont été réalisés *in vitro* sur une suspension d'érythrocytes du sang humain dans le PBS.

1. Préparation du phosphate buffered saline (PBS) :

Pour préparer une solution tampon de PBS à $\text{pH}=7.4 \pm 0,2$, nous avons utilisé les composés suivant avec les concentrations qui correspondent : Na_2HPO_4 (8Mm) ; KH_2PO_4 (2Mm) ; KCl (2.7mM) ; NaCl (137mM) [Mohan, 2006].

2. Préparation de la suspension érythrocytaire :

Le globule rouge (modèle universel de cellule animal en biologie cellulaire et moléculaire) provenant d'un donneur unique sain, le sang utilisé est prélevé sur tube hépariné est centrifugé à 2400 rpm pendant 10 min. Après élimination du surnageant le culot est lavé 2 fois par PBS puis, suspendu à nouveau par PBS avec le même volume que plasma éliminé.

3. Préparation des extraits :

Différentes concentrations d'extraits ont été utilisées (10mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml et 100mg/ml), préparées à partir d'une solution mère d'extrait brut hydroalcoolique solubilisé dans le PBS.

4. L'effet hémolytique :

Le test d'effet hémolytique de la plante étudié est réalisé selon les méthodes décrit par [Guo-Xiang Li et Zai-Qun Lui, 2007 ; Arzanlou *et al*, 2011].

- Mettre dans des tubes à hémolyse 2970 μl de la suspension érythrocytaire préparé avec 30 μl de l'extrait à différentes concentrations initiales (10mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml et 100mg/ml).
- Les concentrations finales dans le milieu d'incubation seraient (0,10mg/ml, 0,25mg/ml, 0,50mg/ml et 1mg/ml).
- Incuber les tubes dans un incubateur de paillasse type Orbital Shaker, Thermo Forma 150rpm à 37°C durant une heure.
- Prélever 500 μl chaque 15 min (0min, 15min, 30min et 60min).

- Ajouter 1,5 ml de PBS.
- Mélanger les tubes délicatement.
- menuiser la réaction avec un bain glaçon.
- Centrifuger les tubes à 2400 rpm durant 10min, le culot est éliminé
- Lire l'absorbance de chaque tube à 548nm (longueur d'onde caractéristique de l'hémoglobine) à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible double faisceau (SPECTROD® 200 PLUS, Type Analytique Jena), contre un blanc contenant du PBS.

Un tube témoin négatif est préparé dans les mêmes conditions expérimentales. Il est composé de 500 µl de suspension érythrocytaire et 1500 µl de solution tampon de PBS, en absence d'extrait.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, préparé un tube d'hémolyse totale qui contient 500 µl de la suspension érythrocytaire et 2500 µl d'eau distillé, en absence d'extrait.

Suivre les mêmes conditions (temps d'incubation, température et pH) et les mêmes démarches expérimentales.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, après 60 min d'incubation, selon la formule suivant :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{A (\text{extrait 60 min}) - A (\text{témoin négatif 60min})}{A (\text{hémolyse totale 60min})} \times 100.$$

Les expériences sont répétées 05 fois dans le but de réaliser une analyse statistique (moyenne, écart type et le test de student).

III. Analyses statistiques :

Les calculs statistiques sont souvent utiles aux biologistes pour la détermination des valeurs normales ou plus exactement des valeurs de référence. Comme pour l'évaluation de précision et l'exactitude d'analyse.

1. La moyenne

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

2. La variance

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

3. L'écart-type

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

5. Test de Student

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

Dans notre étude, les résultats obtenus sont comparés par le tube t_0 (0 min) de chaque concentration

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

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

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

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

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

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

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

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

Si le t calculé ou expérimentale est plus élevé que t_ν de la table de Student, la différence entre les moyennes des deux échantillons est significative [Schwartz, 1992; Amotte, 1971].

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

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

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

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

Hautement significative : $P < 0.0001$ (****).

Résultats et interprétation

I. Tests phytochimiques :

1. Rendements d'extraction :

Les rendements d'extraction et l'aspect d'extraits des graines de nigelle (*N. sativa*) préparés à reflux, par décoction, dans différents solvants à polarité différentes, sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Les rendements d'extractions des graines de Nigelle (*N. sativa*), préparées par décoction dans différents solvants.

Les extraits	Solvants utilisés	Aspects	Rendements (%)
Aqueux (décoction)	Eau	Poudre	31
Hydroalcoolique	Méthanol-eau 70/30%	Poudre	19
Ethérique	Ether de pétrole	Poudre	3,4

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré des rendements d'extraction des graines de nigelle importants, 31% et 19%, dans les solvants polaires (eau et hydroalcoolique, respectivement). Ce rendement est faiblement enregistré après l'extraction des graines par un solvant apolaire (éther de pétrole) d'ordre de 3,4%.

2. screening phytochimiques :

Les tests phytochimiques, réalisés sur les différents modes d'extractions (décoction, macération et infusion), préparés dans différents solvants (eau, éthanol et éther de pétrole) des graines de *N. sativa*, ont permis de détecter les différentes familles des métabolites secondaires présent dans notre plante étudiée par des réactions qualitatives de caractérisation (par précipitation ou par UV ou coloration par des réactifs spécifiques). Les résultats sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résultats des tests phytochimiques des différentes préparations des graines de *N. sativa*.

Métabolites secondaire	Réactifs	Extrait aqueux			Extrait Etérique
		Infusion	Macération	décoction	
Alcaloïdes	Mayer	-	+	++	-
	Wagner	-	+	+++	
Tannins	FeCl ₃	+	+	+	
Flavonoïdes	Mg ⁺⁺	-	-	-	ND
Saponines	Indice de mousse	-	-	+ 333,33	-
Coumarines	Fluorescence U V	-	-	-	-
Stérols et triterpènes	Réaction Liebermann	-	-	-	ND
	Anthraquinones libres	réaction de boritrager	ND		
Les composés réducteurs	Liqueur de Fehling	-	-	+	

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif ; ND : non déterminé.

Le screening phytochimique des graines de la nigelle (*N. sativa* L.) a révélé la présence des alcaloïdes dans l'extrait préparé par macération, cette présence devient plus important dans l'extrait préparé par décoction, par contre les résultats sont négatifs dans l'extrait préparé par infusion et par décoction en milieu éthéré.

Nous avons aussi marqué la présence des composés réducteurs seulement dans l'extrait préparé par décoction dans milieu aqueux.

Les tannins sont présents dans les différentes préparations aqueuses. Par contre les saponines sont présents seulement dans l'extrait préparé par décoction (indice de mousse égale 333).

Les flavonoïdes, les stérols, les terpènes, les coumarines et l'anthraquinone libre sont absents dans les différentes préparations des extraits.

II. Analyse biologique :

1. L'évolution de l'effet hémolytique de plante étudié :

Les figures 09,10 présentent l'évolution de l'effet hémolytique en fonction de temps, par absorbance, durant 60 min, dans un milieu tampon PBS (pH 7,4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37 °C, et en présence des différentes concentrations de l'extrait hydroalcoolique de la nigelle (0,10, 0,25, 0,50 et 1 mg/ml), préparées par décoction, comparées à un témoin négatif (tube contenant que de PBS et la suspension érythrocytaire), et un tube d'hémolyse total provoqué par l'eau distillée.

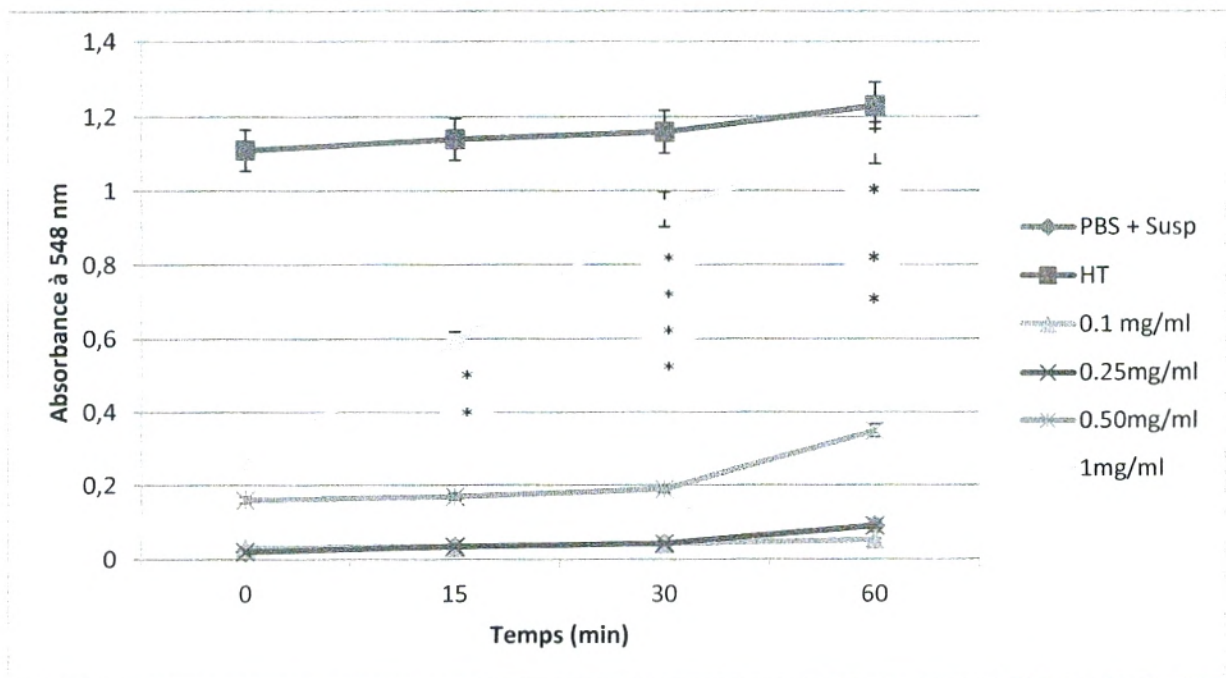


Figure 09 : L'évolution de l'absorbance en fonction du temps des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence de différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de *N. sativa* incubé à 37 °C.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$: signification par rapport Temps 0 min ; PBS : témoin négatif ; HT hémolyse total.

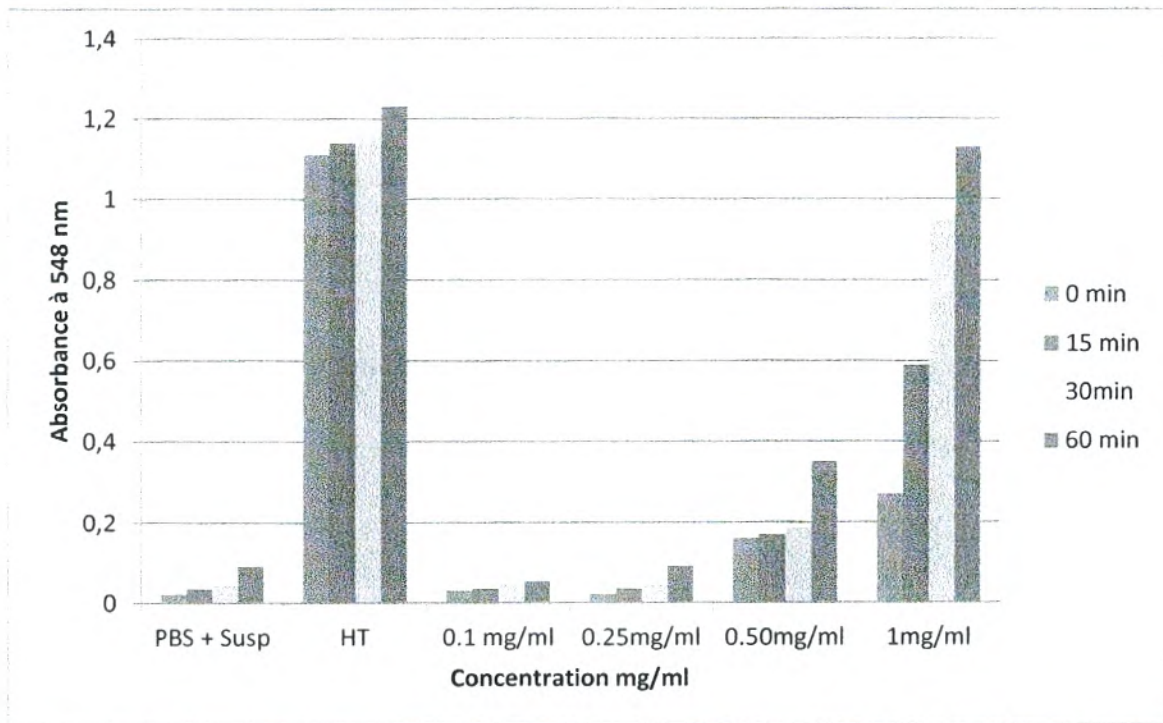


Figure 10 : L'évolution de l'absorbance dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations d'extrait brut hydroalcoolique de *N. sativa* incubé à 37 °C durant 1 heure à 548nm.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$: signification par rapport Temps 0 min ; PBS : témoin négatif ; HT hémolyse total.

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté une augmentation des absorbances durant le temps (0, 15, 30 et 60 minutes) et en augmentant la concentration. Ce qui traduit des taux d'hémolyse augmenté en augmentant les concentrations d'extraits.

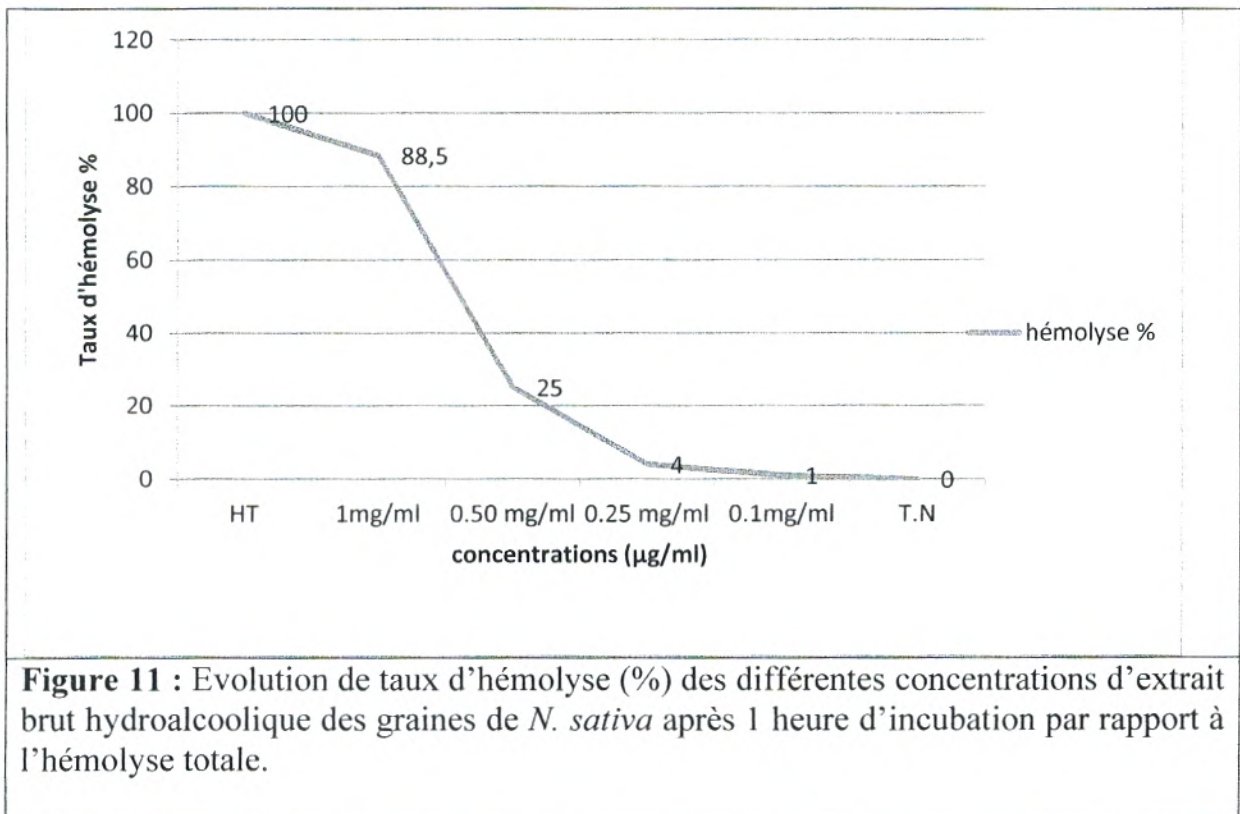
A des concentrations faibles (0,10 et 0,25 mg/ml), nous avons enregistré des taux faibles de l'absorbance qui ne dépasse pas 0,1. De même, nous n'avons pas noté des différences significatives après une heure d'incubation par rapport aux temps 0 min. L'absorbance a passé de 0,031 à 0 min à 0,054 à 60 min en présence d'une concentration d'extrait de 0,25mg/ml et de 0,021 à 0 min à 0,092 à 60 min en présence d'une concentration de 0,50mg/ml.

A une concentration de 0,50 mg/ml, l'absorbance a arrivé jusqu'à 0,35 à 60 min, cette augmentation d'absorbance est non significative par rapport au temps 0min.

Par contre, à une concentration de 1mg/ml, nous avons enregistré un effet hémolytique remarquable de l'extrait brut hydroalcoolique, préparé par décoction, des graines de nigelle. Nous avons noté une augmentation significative ($p < 0,01$) d'absorbance (de 0,27 à 0 min à 0,59) à 15 min et une augmentation hautement

significative ($P < 0,0001$) à 30 min et 60 min (une absorbance de 0,95 et 1,13, respectivement), par rapport aux absorbances enregistré à 0 min. cette augmentation d'absorbance est aussi comparable par rapport au tube d'hémolyse total.

La figure 11, présente les taux d'hémolyse, par pourcentage après 60 minutes dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations de l'extrait hydroalcoolique des graines de la nigelle (0,10, 0,25, 0,50 et 1 mg/ml), préparé par décoction, par rapport au tube d'hémolyse totale contenant la suspension érythrocytaire dans un milieu hypotonique provoqué par l'eau distillé.



D'après les résultats présentés dans les figures ci-dessus, nous avons enregistré des taux très élevé d'hémolyse d'extrait hydroalcoolique à une concentration de 1mg/ml par comparaison à d'autres concentrations (0,10, 0,25, et 0,50 mg/ml) avec un taux d'hémolyse de 88%, par rapport d'hémolyse totale,

Par contre, nous avons noté des taux d'hémolyse très bas d'ordre de 1% et 4%, par rapport à l'hémolyse totale pour les concentrations 0,10 et 0,25 mg/ml des graines de nigelle, respectivement.

Discussion

En plus des traitements conventionnels commercialisés donnés par l'industrie pharmaceutique, la population mondiale se tourne de plus en plus vers les plantes médicinales pour soulager les maladies.

Les plantes médicinales sont employées comme des remèdes pour les maladies surtout les maladies chroniques, grâce aux composants de valeur thérapeutique qu'elles contiennent. Ces composés biochimiques sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à détecter, extraire et doser certains principes actifs existants dans la plantes.

Notre recherche rentre dans le cadre d'évaluation des nouvelles molécules à base de plantes médicinales à effets biologiques, utilisées par la population algérienne. De même, de rechercher d'éventuels effets toxiques de ces plantes.

Notre étude a porté sur une étude phytochimique des différents extraits des graines de nigelle (*Nigella sativa*) et une analyse biologique, basée sur l'effet toxique, *in vitro*, d'extrait brut hydroalcoolique de cette plante, préparé par décoction, en présence des érythrocytes isolées du sang humain.

Les graines de nigelle (*N. sativa*), famille des renonculacées, est une plante très utilisé comme épice et médicament dans le sud ouest d'Algérie et dans tous les régions du payé.

Depuis 1959, plus de 150 travaux portant sur *N. sativa* ont confirmé les effets pharmacologiques des constituants issus de cette plante. La nigelle cultivée renferme plus d'une centaine de composts dont certains n'ont pas encore été étudiés ou identifiés. Une combinaison d'acides gras, d'huile essentielle et d'éléments traces semblent contribuer aux différentes activités pharmacologiques de cette plante [Ghedira, 2006].

En Algérie, la nigelle cultivée (confondue avec la nigelle de Damas) est employée en cas de fièvre, d'algies dentaires, de maux de tête, de rhumes de cerveau, comme diurétique et emménagogue. En infusion, elle est indiquée dans les nausées, les vomissements et les coliques. Écrasées dans l'huile, les graines sont employées comme liniment contre les rhumatismes. Écrasées et prises dans l'eau, elles seraient efficaces contre la constipation et les céphalées [Maire et Savelli 1955, Passager et Barbancon 1956].

Pour les résultats de rendement, il est difficile de comparer les résultats d'extraction avec ceux de la bibliographie ; le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

Les tests phytochimiques effectués sur les différents extraits préparés, par décoction, infusion ou macération dans différents solvants (eau, Méthanol, et éther de pétrole), des graines de nigelle (*N. sativa*), ont révélé la présence d'alcaloïdes, tanins et composés réducteurs. Les saponines ont été faiblement détectées avec un indice de mousse, déterminé, égal à 333. Les tests de recherche des coumarines et des anthraquinones libres, stérols, triterpènes et des flavonoïdes ont été négatifs sur nos échantillons.

Ces résultats confirment ceux rapportés dans la littérature dans les travaux de Aftab *et al.*, 2013 ; Bhupendra Kumar *et al.*, 2009 ; Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007 ; Gali-Muhtasib *et al.*, 2006 ; Ghedira 2006 ; Gilani *et al.*, 2004 ; Goreja 2003 et Atta-ur-Rahman *et al.*, 1995,1992,1985, qui ont souligné la présence des monoterpènes dont la thymoquinone, p-cimène, le carvacrol, le t-anéthole, le 4-terpinéol et la longifoline, également des triglycosides de flavonols, des alcaloïdes tels la nigelline, la nigellicine, la nigellidine, la nigellimine et la N-oxy nigellimine, en plus des protéines, sucres et lipides et récemment, l' α -hédérine, saponine monodesmosidique.

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

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

Dans notre analyse biologique, nous avons constaté des faibles taux d'hémolyses, après une heure d'incubation des érythrocytes isolées en présence des faibles concentrations d'extrait brut hydroalcoolique des graines de nigelle (0,10 et 0,25 mg/ml).

Par contre nous avons souligné un taux d'hémolyse très élevée d'ordre de 88% en présence de 1mg/ml d'extrait testé, par rapport l'absorbance du tube hémolyse totale.

L'étude *in vitro* de l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique des graines de la nigelle a montré que ces taux (88 % d'hémolyse totale) sont plus ou moins importants par rapport d'autres plantes citons *Marrubium vulgare*, *Haloxylon scoparium pomel* et *Zizyphus lotus*, présentent des taux d'hémolyse 6 % ,7 % et 68 % respectivement à des concentrations de 20 μ g/ml [Kadi et Mellouki 2013 ; Moussaoui et Harkati 2013].

La cytotoxicité des graines de la nigelle est probablement due à la richesse de cette plante des alcaloïdes, thymoquinone, saponines et composés phénoliques [Goreja,

2003 ; Al-Ali et al., 2008 ; Lupidi G et al., 2010 Ghedira, 2006]. La nigelle (*N.sativa* L.) est citée comme une plante toxique par plusieurs enquêtes ethnopharmacologiques, [Azzi et al., 2012 ; Tahraoui et al., 2007 et Bnouham et al., 2002]

Toutefois il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature puisque plusieurs facteurs influencent l'analyse qualitative et quantitative depuis la nature de la plante (origine, période de récolte, maturité et partie utilisée) jusqu'aux conditions de la manipulation.

Bien que de nombreuses expérimentations aient rapporté un effet non toxique des graines de nigelle, une étude a montré que la consommation de graines de *N. sativa* sur une longue période serait néfaste pour la santé. Les DL50 obtenues pour des doses uniques d'huile fixe de graines de nigelle par voie orale et intra-péritonéale chez la souris ont été de 28,8 et 2,06 ml/kg respectivement [Zaoui et al 2002].

Des travaux plus récents ont consisté à évaluer les effets aigus et subaigus de la toxicité éventuelle des graines de *Nigella sativa* en recourant aux extraits aqueux, méthanoliques et chloroformiques. Les extraits ont été administrés par voie orale aux rats, à 4 doses différentes : 6, 9, 14 et 21 g/kg, le taux de mortalité et les modifications de poids ont été mesurés pendant 3 et 7 jours respectivement. Aucune mortalité n'a été enregistrée. Par contre, des phénomènes dégénératifs au niveau des cellules hépatiques, avec l'extrait aqueux ont été révélés [Vahdati-mashhadian et al., 2005].

Par ailleurs, d'autres études de toxicité réalisées sur les animaux ont montré que certains paramètres sanguins, comme le métabolisme de l'hémoglobine, les taux de leucocytes et de plaquettes avaient été modifiés par la prise de nigelle [Toparslan 2012].

Conclusion

L'exploitation du potentiel biologique des espèces végétales revêt un intérêt important, ainsi les nouvelles démarches consistent à s'intéresser à la recherche des principes actifs dans les produits naturels d'origines végétales.

A la lumière des résultats obtenus nous avons conclu que : les graines de nigelle (*N. sativa* L.) est riche en alcaloïdes, tannins, et contient aussi des composés réducteurs et saponines.

L'analyse biologique sur l'influence de l'extrait brut hydroalcoolique des graines de nigelle (*N. sativa*) sur les érythrocytes isolés du sang humain a montré une très faible toxicité à des concentrations basses (0,10, 0,25, 0,50 µg/ml) avec un taux d'hémolyse que ne dépasse pas le 25%.

Cette toxicité est très importante à une concentration élevée de 1 mg/ml avec un taux d'hémolyse qui touche 88% par rapport à l'hémolyse totale provoquée par l'eau distillé.

Mais cette étude reste préliminaire et pas indicatif sur le mécanisme réel par lequel agit l'extrait hydroalcoolique sur les hématies, d'autres études complémentaires sont nécessaires pour élucider les mécanismes d'action des différents constituants des graines de *N. sativa* qui peuvent résumés dans les points suivants :

- Séparation, identification et caractérisation des composés actifs dans les extraits des graines par les différentes méthodes d'analyse et aussi d'huiles fixes de la plantes surtout par les méthodes chromatographiques CPG et HPLC.
- Etude de la cytotoxicité des extraits face aux érythrocytes isolés ; en étudiant l'influence de l'extrait sur la pompe Na^+/K^+ (étude de la fuite cellulaire).
- Etude de la toxicologie ; toxicité aiguë, subaiguë et chronique en utilisant les différentes techniques d'étude *in vivo*, l'accomplissement de cette étude est une étape importante afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et de mieux identifier les sites d'action des substances actives.

Références Bibliographiques

Ababsa (2009) ; caractérisation pharmacotoxicologique et étude phytochimique de : *centaurea dimorpha*. ; Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de magister en chimie organique, option phytochimie , université Mentouri Constantine.

Abdelmeguid NE, Fakhoury R, Kamal SM, Al Wafai RJ. (2010); Effects,. of *Nigella sativa* and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes*; 2(4): 256-266.

Abdelwahed A, Bouhlel I, Skandrani I, et al. (2007) ; Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6- pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biol Interact* 165: 1–13.

Ansari A, Sadiq H, Lennart K, Atta U, Wehler T. (1988) ; Structural studies on a saponin isolated from *nigella sativa*. *Phytochemistry* 21: 12,3971-3919.

Aftab A, Asif H, Mohd M, Shah Alam K. et al., (2013) ; A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 3(5): 337-352.

Alemi M, Sabouni F, Sanjarian F, Haghbeen K, Ansari S., (2012) ; Anti-inflammatory effect of seeds and callus of *Nigella sativa* L. extracts on mix glial cells with regard to their thymoquinone content. *AAPS Pharm Sci Tech* Dec 19.

Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA. (2008); Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad* ; 20(2): 25-27.

Al-homidan A. Al-qarawi, A, Al-waily S, Adam S., (2002) ; Response of broiler chicks to dietary *Rhaziya stricta* and *Nigella sativa*. *Br Poult Sci* , 43, 291-296.

Alwashli, et al. (2012); Toxicité aiguë et activité analgésique de l'extrait méthanolique de *Rumex nervosus* Vahl. *Phytothérapie* (10:293–297 © Springer-Verlag France 2012.

Amrit Pal Singh. (2002) ; A treatise on Phytochemistry. B.Sc, B.A.M.S, M.D. (alternative medicine). Edition. *Emidia Science Ltd*.

APG III , (2009) ; An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.*; 161: 105-121.

Atta-ur-Rahman; Matik S, Cun-heng H, et al., (1985) ; Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Lett* 23:2759-2762.

Atta-ur-Rahman, Malik S, Hasan SS, et al., (1995) ; Nigellidine, a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Lett* 36:1993-1996.

Atta-ur-Rahman, Malik S, Zaman K., (1992) ; Nigellimine, a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *J Nat Prod* 55:676-678.

Azzi R, (2013) ; Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de Doctorat en biologie, Option : Biochimie ; Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Sekkal F.Z., Benmehdi H., Belkacem N., (2012) ; Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*; 6(10): 2041- 2050.

Badarg OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, *et al.*, (1998) ; Acute and subchronic toxicity of thymoquinone" in mice. *Drug Develop Res* 44:56, 61.

Benhaddou-Andaloussi A, Martineau L, Vuong T, Meddah B, Madiraju P, Settaf A, et al. The in vivo antidiabetic activity of *Nigella sativa* is mediated through activation of the AMPK pathway and increased muscle glut4 content. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011: 538671.

Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, et al. (2007); Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *Food Chem* 106(1): 132–9.

Bhupendra Kumar et al. (2009) ; A new naturally acetylated triterpene saponin from *Nigella sativa*. *Carbohydrate Research* 344 :149–151.

- Bitra A , Rosu AF, Calina D, Rosu L, Zlatian O, et al,. (2012) ; An alternative treatment for Candida infections with *Nigella sativa* extracts. *Eur J Hosp Pharm*; 19: 162.
- Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyat A. (2002); Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int J Diabetes Metab* 10:33–50.
- Boskabady MH, Mohsenpoor N, Takaloo L., (2011) ; The effect of *Nigella sativa* alone, and in combination with dexamethasone, on tracheal muscle responsiveness and lung inflammation in sulfur mustard exposed guinea pigs *Journal of Ethnopharmacology* 137 :1028– 1034.
- Bouabdelli F, Djelloul A, Kaid-Omar Z, Semmoud A, Addou A. (2012) ; Antimicrobial Activity of 22 Plants Used in Urolithiasis Medicine in Western Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* S530-S535.
- Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J,. (2012) ; Antioxidant, antiinflammatory, anticancer and antibacterial activities of extracts from *Nigella Sativa* (Black Cumin) plant parts. *J Food Biochem* 36(5): 539-546.
- Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, Skandrani I, Falleh H, Marzouk B., (2008); Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots *Pharmacology, toxicology C. R. Biologies* 331 : 48–55.
- Bouxid (2012) ; les plantes médicinales et diabète de type 2 (a propos de 199 cas) mémoire pour l'obtention du doctorat en médecine université sidi Mohammed ben Abdellah Fès Maroc.
- Bruneton J (1993 ;1999) ; Pharmacognosie : Phytochimie & Plantes médicinales. 2^e ; 3^e éd. éditions *techniques et documentation & éditions médicales internationales*, Lavoisier, Paris,France.
- Buchbauer G (2011) ; A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr J*27: 13–39.
- Burits M et Bucar F (2000); Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytoth Res* 14: 323–8.
- Bureau (2008) ; Phytothérapie : l'heure du changement *Phytothérapie* 6 : 213–214.

Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A., (2011) ; Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Compl Altern Med* ; 11: 29.

Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA., (2009) ; Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB (Oxford)*; 11(5): 373-381.

Cheikh-Rouhou S, Besbes S, Hentati B, et al (2007) ; *Nigella sativa* L.: chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chem* 101:673-81.

Clément RP., (2003) ; La phytothérapie dans les pays occidentaux : Aspects réglementaires et commerciaux. De la tradition à l'harmonisation. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Chatenay- Malabry, Paris-XI, n° 23/2002.

Clément RP., (2005) ; Aux racines de la phytothérapie : entre tradition et modernité. *Phytothérapie* 4: 171-175.

Dahmani M. (1997) ; Le chêne vert en Algérie, syntaxonomie, phytoécologie et dynamique des peuplements. Thèse doct. USTHB, Alger, p. 383.

De Smet PA (2002) ; Herbal remedies. *N Engl J Med* 347(25): 2046-57

Dobignard A, et Chatelain C. (2010–2011) ; Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du Nord. vol 1, 2, 3. In Base de données des plantes d'Afrique (version 3.4.0).

Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, et al., (1993) ; Unconventional medicine in the United States. *N Engl J Med* 328: 246-52

Eddouks M, Ouahidi ML, Farid O, Khalidi A, Lemhadi A, (2007) ; L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie* (2007) 5: 194–203.

El Daly ES, (1998) ; Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. *J Pharm Bel* 53:87-95.

- El-Haci I A , Atik-Bekkara F, Didi A, Gherib M, Didi M.A., (2012) ; Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie* 10:280–285.
- Fabricant DS. et Farnsworth NR. (2001); The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect* 109: 69-75.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, (1985) ; Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ* 63: 965-81.
- Hagerman AE, Muller-Harvey I, Makkar HPS (2000) ; Quantification of tanins in tree foliage. FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna, 26p.
- Hammiche V, Merad R, Azzouz M. (2013) ; Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Springer-Verlag France, Paris, 2013.
- Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, et al. (1999) ; Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *Inter J Immun* 21: 283–95.
- Havsteen B.H.,(2002) ; The biochemistry and medical significance of the flavonoïde. *Pharmacoly Therapiae*, 96(2): 67-202.
- Hogan D, Kolter R. (2002) Why are bacteria referactory to antimicrobials. *Current opinion in Microbiology* 5: 272–4
- Hostettmann, K., et al (1998) ; The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimie*, 52, 10-17.
- Houcher Z, Boudiaf K, Benboubetra M, Houcher B. (2007) ; Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa* L. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats. *Pteridines* 18: 8–18
- Gali-Muhtasib H, El-Najjar N, Schneider-Stock R. (2006) ; The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components. *Adv Phytomed* 2:133-153.
- Gamze K"okdil et al (2005) ; Effects of *Nigella unguicularis* fixed oil on blood biochemistry and oxidant/antioxidant balance in rats *Journal of Ethnopharmacology* 99 (2005) 131–135.

Ghannadi A, Haj Hashemi V, Jafarabadi J. (2005) ; An investigation of the analgesic and anti-inflammatory effects of *Nigella sativa* seed polyphenols. *J Med Food* 8: 488–93.

Ghedira K (2006) ; La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie* 4: 220–6.

Ghedira, R. (2010) ; Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) *Phytothérapie* 8: 124–128 © Springer-Verlag France 2010.

Gilani AH, Jabeen K, Khan MAU, (2004) ; A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakist J Biol Sc* 7:441–51.

Gonzalez-Tejero MR, Casares-Porcel M, Sanchez-Rojas CP, et al. (2008) ; Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *J Ethnopharmacol* 116: 341–57

Goreja WG. (2003) ; Black seed: nature's miracle remedy. *New York, NY 7 amazing Herbs Press*.

Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR et al., (2000) ; Plants used against cancer extension of the work of Jonathan Hartwell. *J Ethnopharmacol* 73: 347–77.

Graglia E, Julkunen-Tiito R, Shaver G R., (2001) ; Environmental control and intersite variations of phenolics in *Betula nana* in tundra ecosystems. *New phytologist*, 151:227-236.

Gurif F (2006) Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27: 1–93

Kadi FZ. , Mellouki FZ., (2013) ; Contribution à l'étude phytochimique et l'effet hémolytique d'une tisane utilisé pour le traitement de diabète contenant (*Ajuga iva*, *Mentha viridis*, *Zizyphus lotus*) ; Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de Master en biologie, Option : Biochimie ; Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Khader M, Bresgen N et Eckl PM. (2002) ; In vitro toxicological properties of thymoquinone. *Food Chem toxicol* ; 47 (1) : 129-133.

Khan N et Sultana S. (2005) ; Inhibition of two stage renal carcinogenesis, oxidative damage and hyperproliferative response by *Nigella sativa*. *Eur J Cancer Prev* ; 14(2): 159-168.

Khanbabaee K. et Van Ree T. (2001) ; Tannins : classification and definition, *Natural Products Reports*, 18 : 641-649

Krief S. (2003) ; métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda activités biologiques et étude chimique de plantes consommées thèse : pour obtenir le grade de docteur du muséum national d'histoire naturelle ; discipline : écologie et chimie des substances naturelles.

Laitinen M.L, Rousi M, Julkunen-Tiito R., (2000) ; variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *Journal of Chemical Ecology*, 26 (7):1609-1622.

Lin JK et Weng MS (2006) Flavonoids as nutraceuticals. In: Grotewold E (ed) *The science of flavonoids*. Springer, p 217

Lupidi G. et al (2010) Thymoquinone ,apotential therapeutic agent of *Nigella sativa*, binds to site I of human serum albumin. *Phytomedicine* 17 (2010) 714–720

Maire A, Savelli A., (1955) ; In Salah et le Tidikelt oriental, Etude historique, géographique et médicale. *Arch Inst Pasteur Alger* 33(4): 367-432.

Marin FR, Frutos MJ, Perez-Alvarez JA, et al. (2002) Flavonoids as nutraceuticals: Structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation, *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier Science BV 26, pp. 741–78.

Mekkiou R. (2005) ; recherche et détermination structurale des métabolites secondaires d'espèces du genre *genista* (fabaceae) : *g. saharae*, *g. ferox*, thèse en vue d'obtenir le diplôme de doctorat d'état en chimie organique - option phytochimie Université Mentouri – Constantine.

Moussaoui S., Harkati Z., (2013) ; Contribution à l'étude phytochimique et l'effet hémolytique de trois plantes antidiabétiques : *Eucalyptus globulus*, *Haloxylon scoparium pomel*, *Marrubium vulgare* ; Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de Master en biologie, Option : Biochimie ; Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Mukhallad AM, Mohamad MJM, Hatham D. (2009) Effects of black seeds (*Nigella sativa*) on spermatogenesis and fertility of male Albinos rats. *Res J Med Med Sci* 4: 386–90.

Mueller D. et al (2014) 3D organotypic HepaRG cultures as in vitro model for acute and repeated dose toxicity studies ;*Toxicology in Vitro* 28 104–112.

Omar A, Ghosheh A, Abdulghani A, Peter A. (1999) ; High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 19 757–762

OMS ; Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. WHO/EDM/TRM/2002.1 Organisation Mondiale de Sante Genève.

OMS ; rapport de médecine traditionnelle EB111/9 12 décembre 2002 Organisation Mondiale de Sante Genève.

OMS ; Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023 Organisation Mondiale de Sante Genève.

ONS Algeria, (2008) ; Office National des Statistiques Algeria, Recensement General de la Population et de l’Habitat 2008 Preliminary results of the 2008 population census. Accessed on 2008-07-02.

Ouedraogo et al (2001) ; évaluation in vivo et in vitro de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de racines de *mitragyna inermis* (wilid).o.ktz (rubiaceae) *Pharm. Méd. Trad. Alr*, VoU1, pp. 13-29

Passager P, Barbancon S., (1956) ; Taghit (Sahara oranais) : étude historique, géographique et médicale. *Arch Inst Pasteur Alger* 34(3): 404-475.

Passager P, Dorey R., (1958) ; ElGolea (Sahara algérois) : étude historique, géographique et médicale. *Arch Inst Pasteur Alger* 36(1): 74-152.

Peng L, Liu A, Shen Y, Xu HZ, Yang SZ, Ying XZ., et al, (2013) ; Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF- κ B pathway. *Oncol Rep* ; 29(2): 571-578.

Phuong M. L. (2004) ; The petroleum ether extract of *Nigella sativa* exerts lipid-lowering and insulin-sensitizing actions in the rat *Journal of Ethnopharmacology* 94 251–259

Potterat O (1997) Antioxydants and free radical scavengers of natural origin. *Curr Org Chem* 1: 415–40

Raj Kapoor B, Anandan A, Javakar B. (2002) ; Anti-ulcer effect of *Nigella sativa* Linn. against gastric ulcers in rats. *Curr Sci* 82: 177–9.

Ramawat KG, Dass S, Meeta M. (2002); chemistry diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. In herbal drugs ethnomedicine to modern medicine, Ed Springer verlag Berlin Heidelberg, University Udaipur India; 7-34

Rates SMK, (2001) ; Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-13.

Reboul E., (1953) ; Le Gourara: étude historique, géographique et médicale. *Arch Inst Pasteur Alger* 31(2): 164-246.

Salama RH.(2011) ; Hypoglycemic effect of lipoic acid, carnitine and *Nigella sativa* in diabetic rat model. *Int J Health Sci (Qassim)* 2011; 5(2): 126-134.

Salem ML., (2005) ; Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol* 5:1749-70.

Sayed MD (1980) ; Traditional medicine in health care. *J Ethnopharmacol* 2:19-22.

Schleicher P. et Saleh M., (1998) ; Black seed cumin: the magical Egyptian herb for allergies, asthma, and immune disorders. *Healing Arts Press, Rochester, Vermont*, p 90.

Shin S. et Lim S., (2004) ; Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *J Appl Microbiol* 97: 1289–96.

Tahraoui A., El-Hilaly J., Israili Z.H., Lyoussi B., (2007) ; Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province) ; *Journal of Ethnopharmacology* 110: 105–117.

Tenekoon K. Jeevathayaparan S. Kurukulasooria A. Karunanayake E., (1991) ; Possible hepatotoxicity of *Nigella sativa* seeds and *Dregea volubilis* leaves. *J Ethnopharmacol* , 31, 283-289.

Toparslan C., (2012) ; À propos de *Nigella sativa* L. thèse en vue d'obtenir le diplôme d'état de docteur en Pharmacie, faculté de pharmacie, université de Lorraine France.

Vahdati-mashhadian N., Rakshandeh H., Omid A. (2005) ; An investigation on LD50 and subacute hepatic toxicity of *Nigella sativa* seed extracts in mice. *Pharmazie*, 60 (7), 544-547.

Veesenmeyer et al., (2009) ; *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med* ; 37: 1826-182.

Vermerris W. et Nicholson R. (2006) ; phenolic compound biochemistry, *Springer, Dordrecht*. ISBN-10 1-4020-5163-8.

Warrier PK, Nambiar VPK, Ramankutty. (2004); Indian medicinal plants-a compendium of 500 species. *Chennai: Orient Longman Pvt Ltd* p. 139-142.

Wichtl M. et Anton R. (2003) ; Plantes thérapeutiques. *Tec & Doc Lavoisier/EMI, Paris*.

Woo CC. Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, et al., (2011) ; Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR- γ pathway. *Biochem Pharmacol* ; 82(5): 464-475.

WHO (2002) ; Fact Sheet No. 271. World Health Organisation, Geneva

Yi Ren et al., (2009) ; Floral development in Adonideae (Ranunculaceae) *Flora* 204 506–517

Zaghlol D., Kamel E., Mohammed D., Abbas N. (2012) ; The possible toxic effect of different doses of *Nigella sativa* oil on the histological structure of the liver and renal cortex of adult male albino rats. *Egypt J Histol* , 35 (1), 127-136.

Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, et al. (2002) ; Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine* 9: 69–74

Zaoui A, et al (2002) ; Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *J Ethnopharmacol* 79:23-6

Zhang M, Hongfei J, Aiti A, et al. (2008) ; A tree sequence alignment based tree-to-tree translation model. *ACLHLT* 08: 559–67.

Annexes

Le matériel végétal

Epuisement dans 03 milieux

Milieux aqueux

Eau distillé

Milieu entérique

Ether de pétrole

Milieu hydroalcoolique

Méthanol/eau (70/30)

Extraits aqueux

extrait étheré

extrait hydroalcoolique

Analyse phytochimique

Analyse biologique

Matériel végétal 10 g
↓
Filtration
↓

Les tests phytochimiques			
Les extraits à analyser	Décoction	macération	Infusion
	En milieu aqueux		
alcaloïdes	1 ml de chaque extrait dans un tube à essai + Quelques gouttes d'acide chlorhydrique		
	05 gouttes de réactif de Mayer		05 gouttes de réactif de Wagner
	Résultats	Précipité blanc	Précipité brun
tanins	5 ml de chaque extrait dans un tube à essai		
	1 ml de FeCl ₃ dilué 1%.		
	Résultats	coloration verdâtre	Coloration bleu-noirâtre
	Résultats	Tanins galliques	Tanins catéchiques
flavonoïdes	5 ml de chaque extrait dans un tube à essai		
	1 ml d'alcool iso amylique + Quelques copeaux de Mg ⁺⁺ + Quelques gouttes d'acide chlorhydrique		
	Résultats	Coloration rouge ou rose (en trois minutes).	
Coumarines	2 ml de chaque extrait dans un tube à essai		
	0.5 ml de NH ₄ OH à 25% ; mélanger et observer sous UV à 366 nm contre un témoin		
	Résultats	Fluorescence intense	

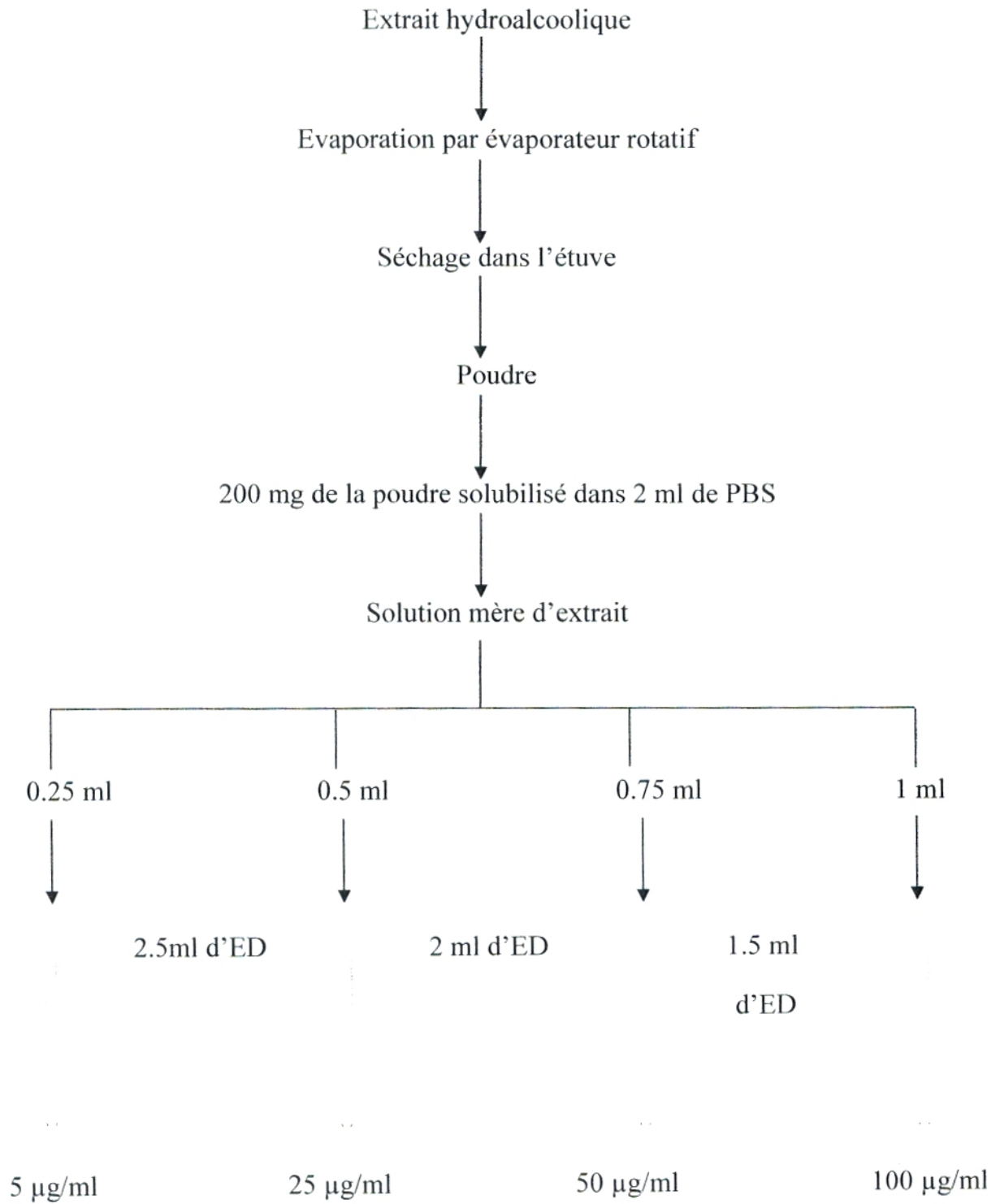
Figure 12 : représentation schématique des tests phytochimiques.

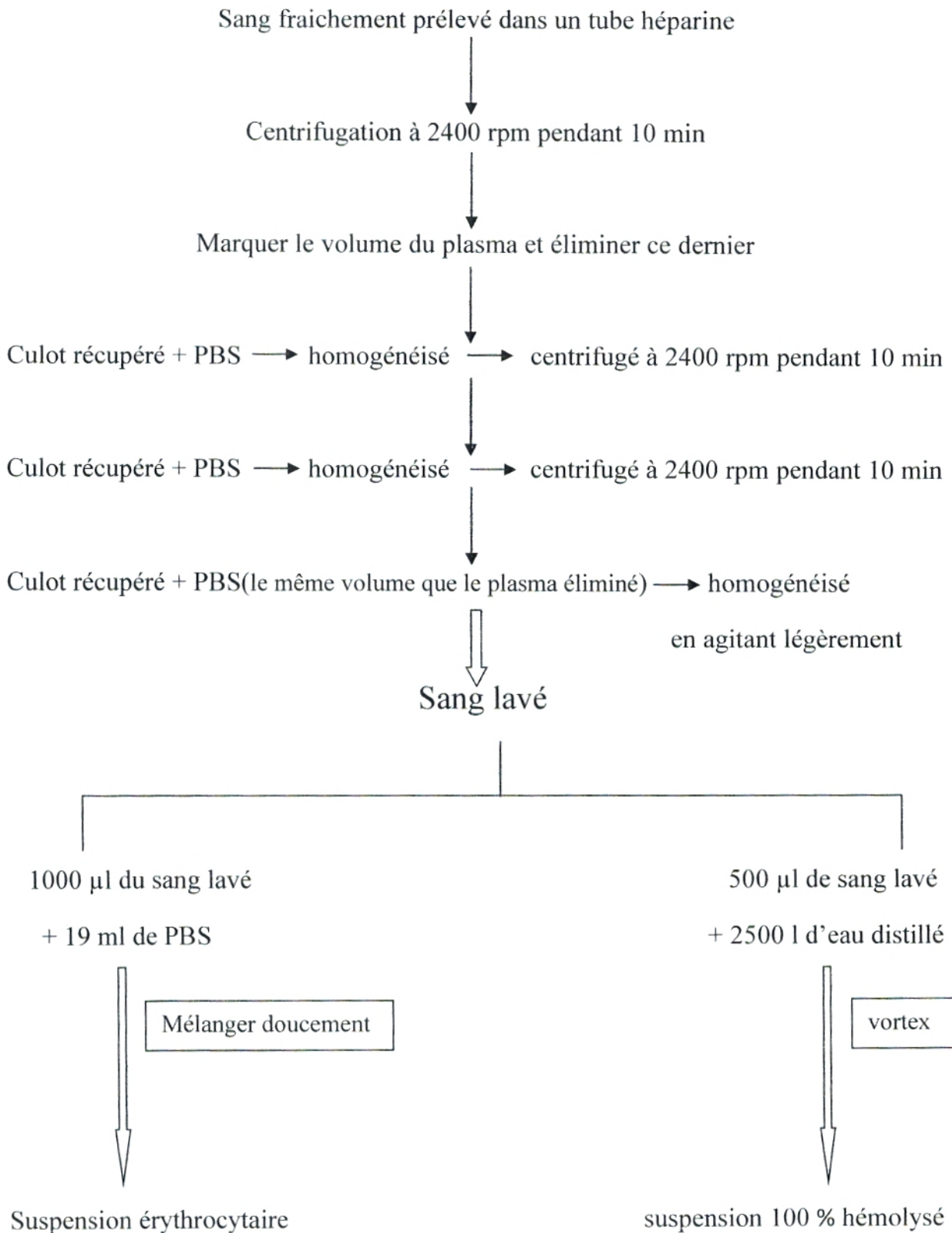
Matériel végétal 10 g
↓
Filtration
↓

Les tests phytochimiques

Les extraits à analyser	décoction	macération	Infusion	
	En milieu aqueux			
saponines	(1, 2, 3...10) ml de chaque extrait dans 10 tubes à essai numérotés respectivement			
	Ajuster le volume à 10 ml dans chaque tube avec ED Agiter horizontalement chaque type pendant 10 s de raison de 2 agitation/sec Laisser 15 minutes à reposé			
	Résultats	Développe ou non d'une mousse ; mesurer la mousse produite par chaque tube Calculer l'indice de mousse $I=1000/N$ (N : le numéro du tube ou l'hauteur de mousse =1)		
Stérols et triterpènes réaction de Leibermann Buchard	05 ml dans un bécher			
	5 ml d'anhydride acétique + 5 ml de CHCl_3 + 1 ml de H_2SO_4 concentré à la paroi de bécher à l'aide d'une pipette et laisser 20 minutes.			
	Résultats	coloration violacée fugace	Coloration vert-bleu	Coloration vert-bleu
	Résultats	Stérols et stéroïdes	Hétérosides Stéroliques	Hétérosides triterpéniques
Composés réducteurs	2 ml de chaque extrait dans un tube			
	2ml de liqueur de Fehling + incuber l'ensemble dans bain marie bouillant pendant 10 min			
	Résultats	précipité rouge brique		

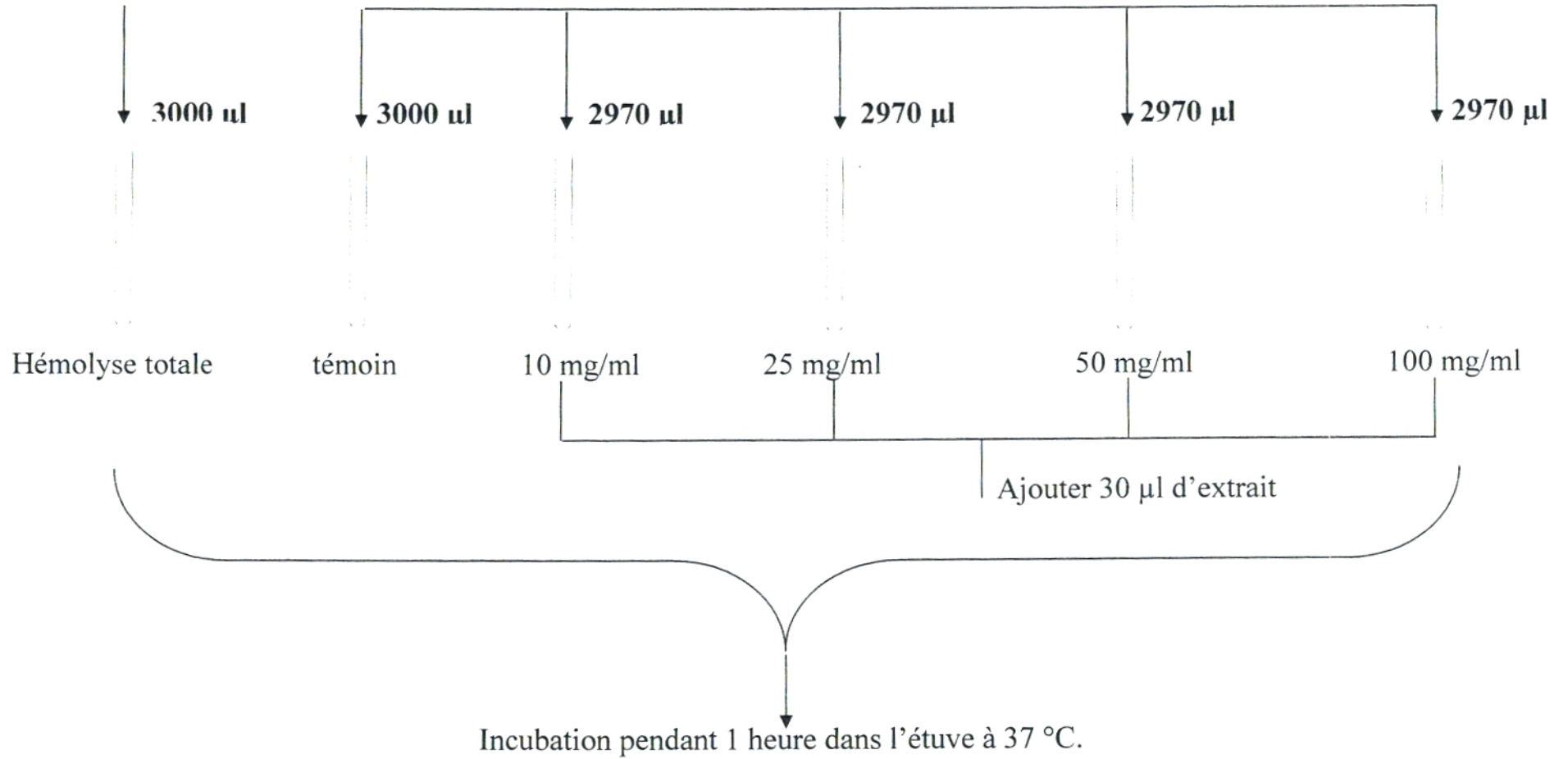
Figure 12 : représentation schématique des tests phytochimiques 'suite'.



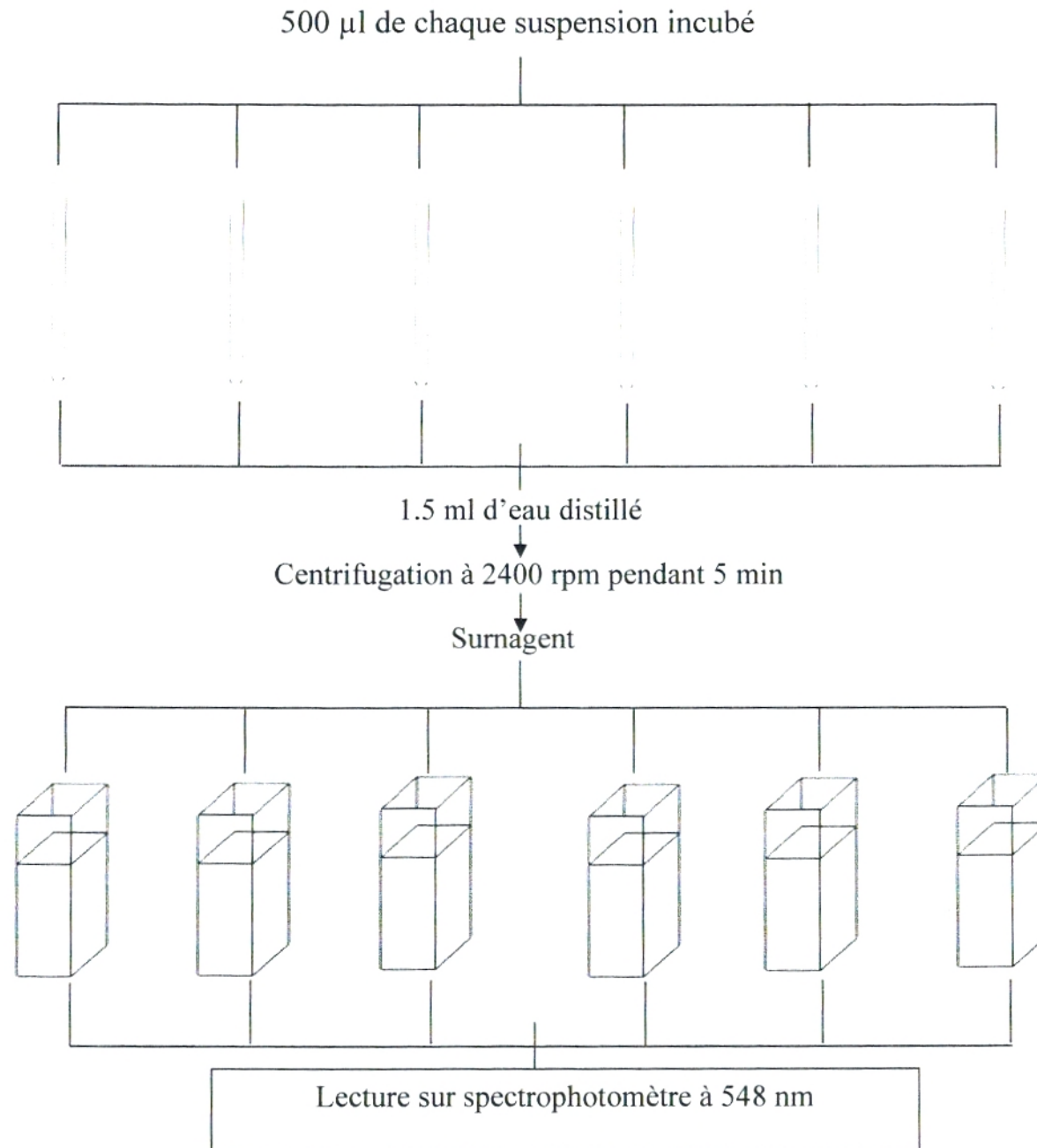


Suspension 100 %
hémolysé

Suspension érythrocytaire



Faire des dilutions avec le tampon chaque 15 min et lecture au spectrophotomètre à 548 nm.



Préparation des réactifs pour tests Phytochimiques

Réactif de Mayer :

Solution A : 1.358g de chlorure de mercure $HgCl_2$ sont dissous dans 60 ml d'eau distillée ;

Solution B : 5g d'iodure de potassium KI sont dissous dans 10ml d'eau distillée ;

Les solutions A et B sont mélangées extemporanément et le volume final est ajusté à 100ml avec d'eau distillée.

Réactif de Wagner :

2g de KI et 1,27g de I sont dissous dans 75ml d'eau distillée, puis ajustés à 100ml avec d'eau distillée.

Liqueur de Fehling :

Solution A : solution de sulfate de cuivre à 40 g/l ;

Solution B : 200 g de tartrate de potassium-sodium et 150 de NaOH pour 1 litre d'eau distillée ; Mélanger les deux solutions à volumes égaux (à mélanger juste avant l'emploi).

PBS :

Phosphate buffered saline PBS est une solution tampon très utilisé dans la recherche biologique moderne : est une solution salé contient le chlorure de sodium, le sodium phosphate, le chlorure de potassium et le potassium phosphate.

Le tampon utilisé pour la maintenance de pH constant, l'osmolarité et les concentrations d'ions de solution toujours utilisé ceux d'être humain (milieu isotonique), le PBS a beaucoup des utilisations parce qu'il considère comme isotonique et non-toxique pour la cellule.

Temps min	PBS+susp	HT	0,10 mg/ml	0,25 mg/ml	0,50 mg/ml	1 mg/ml
0	0.030± 0.03	1.11± 0.25	0.031±0.0005	0.021±0.001	0.16±0.08	0.27±0.11
15	0.036± 0.03	1.14± 0.26	0.035±0.0064	0.035±0.001	0.17±0.09	0.59±0.23
30	0.039± 0.03	1.16± 0.27	0.043±0.0013	0.044±0.006	0.19±0.09	0.95±0.14
60	0.041± 0.04	1.23± 0.22	0.054±0.006	0.092±0.002	0.35±0.2	1.13±0.22

Tableau 7 : L'évolution de l'absorbance des tubes contenant une suspension érythrocytaire en présence de différentes concentrations d'extrait brute hydroalcoolique de *N. sativa* incubé à 37 °C durant 1 heure à 548nm.

concentration	0,10 mg/ml	0,25 mg/ml	0,50 mg/ml	1 mg/ml
Taux d'hémolyse (%)	1	4	25	88

Tableau 8 : L'évolution de taux d'hémolyse des différentes concentrations d'extrait brute hydroalcoolique de *N. sativa* après 1 heure d'incubation par rapport à l'hémolyse total.

Résumé

Notre étude porte sur une plante médicinale (*Nigella sativa* L) très utilisé comme aliment (dans divers plats traditionnelle), et comme médicament en thérapie traditionnelle dans divers pathologies.

L'intérêt de notre étude est de contribuer à l'analyse phytochimique de différentes préparations et extraits de la plante, et d'évaluer l'effet toxique de l'extrait brut hydroalcoolique des graines de la nigelle sur des érythrocytes isolés du sang humain, incubés dans un milieu tampon PBS à pH 7.4, en présence des différentes concentrations d'extraits.

L'analyse phytochimique des graines de la nigelle (*N. sativa* L). a révélé la présence des alcaloïdes, des tannins, saponines et composés réducteurs.

Les résultats ont montré un effet hémolytique important d'extrait brut hydroalcoolique des graines de nigelle (*N. sativa* L), préparé par décoction.

Cet effet est hautement significative à une concentration initiale d'extrait à 100 mg/ml d'ordre de 88 % par rapport d'un témoin positif représenté par l'hémolyse totale.

Par contre, cet effet est non significative à des concentrations faibles (10, 25 et 50 mg/ml) avec un taux d'hémolyse enregistré d'ordre 1 %, 4 %, et 25 % respectivement.

Mots clés : *Nigella sativa* L., analyse phytochimique, effet hémolytique, cytotoxicité,

ملخص

تعتبر الحبة السوداء (السانوج) نبتة كثيرة الاستعمالات ، تستعمل كإحدى التوابل في مختلف الأطباق التقليدية وكدواء لمعالجة عديد الأمراض الشائعة في الجهة الجنوب غربية للجزائر

تكمّن أهمية هذه الدراسة في مقارنة للتحليلات الكيميائية النباتية لمختلف مستخلصات النبتة مع تقييم تأثير سمومية مستحضر كحولي لبذور النبتة على كوريات الدم الحمراء المعزولة من الدم البشري المحتضنة في وسط عازل الفوسفات في درجة الحموضة 7.4 لمدة ساعة واحدة .

كشف التحليل الكيميائي النباتي وجود الصابونين ، الغلوبيدات، العفص والسكريات المرجعة.

فيما أظهرت نتائج الفحص البيولوجي أن تأثير الانحلال هو أكثر أهمية لاستخراج السم من قبل النبتة وذلك بتركيز 100 ملغ/ملم مع قدرة امتصاص تقدر ب 1.13 مع ظهور تطورات ذات أهمية عالية عبر الزمن خاصة عند 30 و 60 دقيقة. في الناتج يمكن أن نحدد نسبة الانحلال ب 88 % بالنسبة للمستخلص الكحولي بتركيز 100 ملغ/ملم مقارنة بالتركيز الأخرى 1 ، 4 و 25 % ل 10، 25، 50 ملغ/ملم بالنسبة للانحلال الكلي.

كلمات البحث : الحبة السوداء، التحليل الكيميائي النباتي، تأثير الحالة للدم، السمومية.