



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

**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN**

# Mémoire

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

**MASTER EN CHIMIE**

Spécialité : Chimie Analytique

Par :

**Mr BENGUERFI Mohammed Wassim**  
**Mr BENAMMAR Amen Allah**

Sur le thème

---

## **Extraction solide-liquide sur pilote de graine aromatique**

---

Soutenu publiquement le 19 juin 2018 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr ABDERRAHIM Omar	Professeur	Université ABB Tlemcen	Président
Mr DIDI Mohammed Amine	Professeur	Université ABB Tlemcen	Rapporteur
Mr BELKHOUCHE Nasr Eddine	Professeur	Université ABB Tlemcen	Examineur

*Laboratoire de technologie de séparation et purification (LTSP)  
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

## Remerciement

*Tout d'abord nous remercions « Allah » le tout puissant de nous avoir donné la force pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous remercions Mr DIDI Mohammed Amine directeur de laboratoire LTSP.*

*Nos sincère remerciement à Mr ABDERRAHIM Omar professeur à l'université d'ABB Tlemcen de nous avoir honoré de présider ce jury.*

*Nous adressons notre profonde reconnaissance à Mr BELKHOUCHE Nasr Eddine professeur à l'université d'ABB Tlemcen d'avoir accepté d'examiner et juger ce travail.*

*Toute notre gratitude et notre considération respectueuse s'adressent à Mr DIDI Mohammed Amine professeur à l'université d'ABB Tlemcen, de nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail avec disponibilité et bienveillance, nous le remercions pour ses conseils, son aide et l'effort fournis durant toute cette période.*

*Nos vifs remerciements s'adressent également à madame HASSAINE Hafida professeur à l'université d'ABB Tlemcen et directrice de laboratoire LAMAABE, à madame BELLIFA Samia maître de conférences B et aux étudiantes CHERIF BEMMOUSSA Nariman et CHIALI Amel d'avoir accepté de travailler avec nous en collaboration pour mener ce travail à la perfection.*

*A la fin nous présentons nos sincères remerciements aux ingénieurs de laboratoire LTSP, ainsi que tous nos amis et ce qui nous sont chers pour leurs aides sans conditions et pour leur amitié.*

## *Dédicace*

*Je remercie tout d'abord mon Dieu le tout puissant qui m'a donné la volanté, la force et le dévouement pour réaliser ce modeste travail.*

*Je dédie ce travail à mes parents mon père le professeur d'éducation à la retraite, Noureddine ; à ma mère MEDJDOUB Rafika, ma source de tendresse, de patience, de force, je t'aime ma précieuse maman.*

*A ma très chère sœur Hayem, à son mari Yacine, à mes tentes et oncles chacun par son prénom, à mes grand-parents, à toute la famille sans aucune réserve, qui m'ont donné de leur volanté et force pour continuer mes études.*

*A mon adorable frère Moudjib, qui m'a soutenu durant tout mon cursus éducatif, je t'aime mon petit frère.*

*A mon binôme, BENAMMAR Amen Allah, qui sans lui ce travail n'aurait pas fini.*

*A tous mes cousins, cousines, amis, amies et a tout ma promotion de l'année 2017/2018.*

*Je vous adore....*

*Wassim*

## *Dédicaces*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance que je dois aux personnes qui ont participé de près ou de loin à la réussite de ce travail.*

*Je dédie ce mémoire aux enseignants et professeurs qui ont marqué mon parcours universitaire.*

*A mes collègues de master chimie analytique.*

*A ma très chère maman, BOUABDELLAH Zoubida. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de mon profond amour. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour. Tu n'as cessé de m'encourager et me soutenir durant toutes les années de mes études. Tu es toujours présente quand il le fallait, que dieu te garde pour nous ma chérie.*

*A mon héros papa BENAMMAR Farid ou ABI comme j'ai toujours appelé. Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de responsabilité et de confiance, je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai le meilleur*

*pour ne jamais te décevoir. Que dieu t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.*

*A ma grande mère maternelle le tout qui nous reste. AMA, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.*

*A mon très cher jumeau Anes, en souvenir d'une enfance dans nous avons partagé le meilleur et le pire, nous voilà aujourd'hui arrivés d'accomplir un nouveau défi toujours ensemble. Je te souhaite le meilleur dans l'avenir.*

*A mes sœurs Maniâa, Sihem, et Youssra. A mon frère Ilies et sa femme Ismaïen. Mes beaux-frères, je vous dédie ce travail en termes de complicité que vous m'avez apporté.*

*Mes neveux et nièces, je vous dédie ce travail pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré.*

*A ma grande famille, oncles, tantes ainsi que mes cousins et cousines.*

*Ce travail est un témoignage de mon attachement et d'amour à ma plus chère Nariman. Dieu te bénisse et te garde pour moi.*

*Mes amis les filles Lyna, Radja, Sarah, Soumia et les garçons Benali, Charaf, Mounir, Hacem. Je vous dédie ce*

*travail. Puisse Dieu le tout puissant exhausser tous vos vœux.*

*Mon binôme, BENGUERFI Mohammed Wassim, le travail avec toi est un plaisir je ne te remercie jamais assez. Que dieu te préserve le meilleur dans ton avenir.*

*BENSELAMA Wafaa et comment puis-je ne pas citer, ta rencontre m'a marqué la vie tu étais toujours là pour moi, tu réponds toujours présente, c'est les études qui nous ont rapproché. Pour moi tu es une personne inoubliable que dieu te donne la force d'achever ton travail.*

*Mes amis du travail, Zahi ainsi que tous ceux qui m'aiment et que j'aime et j'ai oublié de les citer. Je vous dédie ce travail.*

*Le personnel de l'association forêt modèle particulièrement Mr KHELIL Bensalem et KORSO Latifa, je vous dédie ce travail et je vous remercie pour la participation par la matière première de ce travail.*

*Je vous adore....*

*Amen*

# Table des matières

Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale .....	5
<b>Chapitre I : Description botanique</b>	
I. Description végétale .....	6
II. historique .....	11
III. Production et commerce international .....	12
IV. Propriétés médicinales de la nigelle .....	12
V. Composition chimique des graines .....	13
VI. Produits à base d'huile de nigelle .....	18
<b>Chapitre II : Méthodes d'extraction</b>	
I. Généralités sur les techniques d'extraction .....	20
I.1 Intérêt de l'extraction .....	20
I.2 Les méthodes d'extractions .....	20
I.2.1 Décoction (INFUSION) .....	20
I.2.2 Macération .....	20
I.2.3 Hydrodistillation ou entrainement à la vapeur .....	21
I.2.4 Distillation .....	21
I.2.5 Extraction par solvant .....	21
I.2.5.1 Types d'extraction par solvant .....	21
I.2.5.2 Extraction directe .....	21
I.2.5.3 Extraction liquide-liquide .....	21
I.2.5.4 Extraction solide-liquide .....	22
II. Description de pilote MP1035 .....	23
II.1 Principe de fonctionnement .....	23
II.2 Equipement .....	24
II.3 Instrumentation .....	24
III. Mise en route générale .....	25

IV. Remplissage des produits .....	27
V. Extraction solide-liquide.....	27
VI. Arrêt de l'installation.....	28
VII. Maintenance et entretien.....	28

### **Chapitre III : matériels et méthodes**

I. Matériel végétal .....	30
II. Extraction des huiles.....	30
II.1 extraction de l'huile fixe .....	30
II.2 extraction de l'extrait brut.....	31
II.3 L'extraction de l'huile essentielle .....	31
III. Rendement .....	31
IV. Dosage des polyphénols totaux .....	31
V. Dosage des flavonoïdes totaux .....	32
VI. Activités biologiques .....	33
VI.1 Etude de l'activité antioxydante.....	33
VI.1.1 METHODE DE FRAP (Ferric reducing antioxidant power) .....	33
VI.1.2 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	34
VI.2 Activité antimicrobienne.....	36
VI.2.1 Activité antiadhésive.....	36
VI.2.2 Activité anti-biofilm.....	37
VII. Analyse physico-chimique .....	37
VII.1 Densité .....	37
VII.2 Indice de réfraction.....	37
VII.3 Indice d'acide .....	38
VII.4 Indice de saponification.....	38
VIII. Spectrométrie infrarouge a transforme de fourrier.....	39
IX. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	40

### **Chapitre IV : résultats & discussion**

I. Rendement des extraits.....	41
II. Dosage des polyphénols totaux .....	42
III. Dosage des Flavonoïdes totaux .....	44
IV. Etude de l'activité antioxydante .....	45
IV.1 Piégeage du radical DPPH.....	45
IV.2 Test de réduction de FRAP.....	48
V. Activité antimicrobienne .....	50



V.1 Activité antiadhésive.....	50
V.2 Activité anti-biofilm.....	51
VI. Paramètres physico-chimiques .....	52
VII. Spectroscopie IRTF .....	54
VIII. Chromatographie sur couche mince .....	55
Conclusion générale .....	58
Références bibliographiques .....	59

## ملخص :

عرف استخلاص الزيوت الطبيعية و الأساسية من النباتات الطبية و العطرية رواجاً كبيراً في الآونة الأخيرة و ذلك لاحتوائها على مكونات كيميائية هامة التي بدورها تدخل في تركيب مختلف الادوية و المكملات الغذائية و مستحضرات التجميل

يمكن إستخلاص هذه الزيوت بعدة طرق، نهتم في هذه المذكرة بالإستخلاص الصلب السائل الغير المتواصل عن طريق جهاز نصف صناعي الذي أعطى مردوداً جيداً مقارنة بالطرق الأخرى

كذلك في سياق هذه الدراسة قمنا بتحليل بيولوجية منها مضادات الاكسدة و مضادات البكتيريا, و تحليل أخرى فيزيوكيميائية على مستخلصات حبة البركة حيث اظهرت هذه الدراسة نتائج محفزة

كلمات رئيسية : إستخلاص - الزيوت النباتية - حبة البركة - مضادات الاكسدة - تحليل فيزيوكيميائية

## Résumé :

L'extraction des huiles végétales des plantes aromatiques et médicinales, a fait l'objet de recherche de plusieurs études récentes grâce à leur richesse en métabolismes secondaires qui entrent dans la fabrication des médicaments, compléments alimentaires et produits cosmétiques.

Dans ce mémoire on s'intéresse à l'extraction solide-liquide discontinue sur pilote *MP1035* des graines de *Nigella sativa*.

Des analyses biologique et physicochimique ont été effectuées sur les extraits de cette graine afin de valoriser cette dernière.

Cette étude a donnée des résultats très prometteurs en ce qui concerne l'efficacité des extraits sur les radicaux libres et les souches bactériennes.

Mots-clés : extraction solide-liquide, *Nigella sativa*, huile végétale, anti-oxydant, analyses phytochimiques, analyse biologique.

## Abstract :

The extraction of vegetable oils from aromatic and medicinal plants has been the subject of research in several recent studies. Because of their richness in secondary metabolisms which are part of the manufacture of drugs, food supplements and cosmetic products.

In this thesis we are interested in discontinuous solid-liquid extraction on pilot *MP1035* of seeds of *Nigella sativa*.

Biological and physico-chemical analysis were carried out on the extracts of this seed, in order to value this one.

This study gave very promising results with regard to the efficiency of the extracts on free radicals and bacterial strains.

Key words: solid-liquid extraction, *Nigella sativa*, vegetable oil, antioxidant, phytochemical analysis, biological analysis.

# Liste des figures

## Chapitre I : Description botanique.

Figure 1 : Classification botanique selon Bentham et Hooker.

Figure 2 : Fleur de la plante *Nigella Sativa*.

Figure 3 : Graines de *Nigella Sativa*.

Figure 4 : *Nigella sativa* (à gauche), *N. damascena* (à droite).

Figure 5 : Représentation de différentes espèces du genre *Nigella*. (a-b) *N. sativa* (c) *N. damascena* 'Cambridge Blue' (d) *N. arvensis* (e) *N. orientalis*

Figure 6 : Les graines de différentes espèces de nigelles. (a / *N. arvensis* L., b/ *N. damascena* L., c/ *N. hispanica* L., d/ *N. integrifolia* Regel, e/ *N. nigellastrum* Willk., f/ *N. sativa* L., g/ *N. orientalis* L)

## Chapitre II : Méthodes d'extraction.

Figure 1 : Pilote d'extraction solide-liquide discontinue et distillation discontinue MP1035.

Figure 2 : Schéma représentant les différentes parties du pilote.

## Chapitre III : Matériels et méthodes.

Figure 1 : Appareil UV-Visible.

Figure 2 : appareil infrarouge à transforme de Fourier.

## Chapitre IV : Résultats & discussion.

Figure 1 : Rendement en extrait.

Figure 2 : Courbe d'étalonnage en acide gallique.

Figure 3 : Teneur en polyphénols des extraits.

Figure 4 : Courbe d'étalonnage en quercétine.

Figure 5 : Teneur en flavonoïdes des extraits.

Figure 6 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut.

Figure 7 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'huile fixe.

Figure 8 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations en acide ascorbique.

Figure 9 : Les IC<sub>50</sub> des différents extraits et l'acide ascorbique.

Figure 10 : Pouvoir réducteur de l'extrait brut et l'acide ascorbique.

Figure 11 : Dénombrement de témoin de *Nigella sativa*.

Figure 12 : Activité anti-adhésive du *N.sativa* sur *P. aeruginosa* à 10%, 20%, 30% et 50% respectivement.

Figure 13 : Activité anti-biofilm de *N.sativa* sur *P. aeruginosa* à 10%, 20%, 30% et 50% respectivement.

Figure 14 : Superposition des 3 spectres des échantillons testés.

Figure 15 : Superposition des 3 spectres des standards utilisés.

Figure 16 : 1<sup>er</sup> système.

Figure 17 : 2<sup>ème</sup> système.

# Liste des tableaux

## **Chapitre I : Description botanique.**

Tableau 1- Les différentes espèces du genre Nigella.

Tableau 2- Composition des graines de Nigella sativa.

Tableau 3- Composition phénolique de la graine de Nigella sativa.

Tableau 4- Composition (en pourcentage) des graines N. sativa en acides gras selon l'origine de l'échantillon.

Tableau 5- Liste des produits à base de Nigelle vendus sur internet.

## **Chapitre II : Résultats & discussion.**

Tableau 1 : paramètres physicochimiques des huiles fixes.

Tableau 2 : Bandes caractéristiques des échantillons.

Tableau 3 : Bandes caractéristiques des standards.

## Liste des abréviations

$\mu\text{L}$  : microlitre.

A : absorbance.

CCM : chromatographie sur couche mince.

cm : centimètre.

g : gramme.

GAE/g E : équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait brut.

h : heure.

ha : hectare.

HE : huile essentielle.

HF : huile fixe.

HZ : Hertz.

kg : kilogramme.

kW : kilowatt.

L : litre.

m : mètre.

mg : milligramme.

mL : millilitre.

mm : millimètre.

$n^{20}$  : indice de réfraction à 20°C.

nm : nanomètre.

NPK : azote, phosphore, potassium.

p : poids.

PVC : polychlorure de vinyle.

QRE/g E : équivalent quercétine par gramme d'extrait brut.

R : rendement.

TCP : plaque de culture de tissu.

V : Volte.

v : volume.

VR : Vanne de réglage.

# **INTRODUCTION GENERALE**

Des végétaux, il y a ceux qui nourrissent, ceux qui tuent et ceux qui soignent. Le monde végétal se croise jusqu'à aujourd'hui avec la recherche scientifique. Des plantes médicinales s'est développée une vraie pharmacie. Elle est devenue indispensable dans la vie quotidienne. Il en a découlé une médecine qui continue à révéler ses vertus pures. Parmi ces végétaux, la graine de Nigella Sativa n'a cessé de montrer ces vertus thérapeutiques, sa graine en a sa consécration.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la mise en valeur de la graine Nigella sativa. Afin d'étudier la mise en valeur du pilote solide-liquide sur cette graine acquis au sein du laboratoire LTSP, nous avons réalisé ce mémoire qui se subdivise en quatre chapitres.

Le premier correspond à une étude bibliographique portant sur la description botanique,

Dans le deuxième chapitre, sont présentées les méthodes d'extraction,

Dans le troisième chapitre, sont décrits les matériels et méthodes,

Enfin, dans le quatrième chapitre, sont détaillés les résultats avec une discussion qui se termine par une conclusion générale.



CHAPITRE I  
DESCRIPTION BOTANIQUE

## Introduction

Depuis son existence, l'homme a fait le choix des végétaux : ceux qui nourrissent, ceux qui tuent et ceux qui soignent. Le monde végétal est resté longtemps la seule thérapie avant l'avènement de la recherche scientifique. Une alchimie merveilleuse a fait des plantes médicinales une vraie pharmacie. Cette dernière tombait de plus en plus à l'oubli avant de redevenir indispensable dans la vie quotidienne. Cette médecine douce révèle ses vertus pures, sans additifs ni matières conservatrices.

En phytothérapie, le mode de traitement diffère de celui de la médecine actuelle. Des cures sur le long terme et écartement définitif du mal, par contre la médecine moderne n'agit qu'en symptomatique (supprimer la cause du mal) ; le trouble peut persister ou se déplacer sur un autre organe.

Les plantes sont depuis toujours une source habituelle de remèdes sous forme de préparations traditionnelles ou de principes actifs purs. La plante médicinale est généralement sauvage, pousse toute seule dans la nature, elle est exploitée par l'homme pour ses bienfaits pour la santé.

La nigelle ou *Nigella sativa* cultivée, a connu plusieurs noms selon la région où elle était utilisée ; appartient à une famille de plantes dicotylédones appelée les Renonculacées. Originaire de la région méditerranéenne, la nigelle a été connue dans plusieurs pays où son utilisation varie selon le besoin, d'un épice dans leurs cuisines à d'autres utilisations cosmétologiques et thérapeutiques.<sup>1</sup>

## I. DESCRIPTION VEGETALE

---

*Nigella* cultivée est une plante herbacée florale, a une tige dressée qui peut atteindre 60 cm en hauteur, ses feuilles basales et culinaires ressemblants à des pattes d'araignée sont finement divisées en petites lanières courtes, des fleurs très délicates de cinq à dix pétales selon les variétés, elles peuvent être colorées du bleu sombre au clair, rose jusqu'au blanc elle fleurit juin-juillet.<sup>2-3</sup>

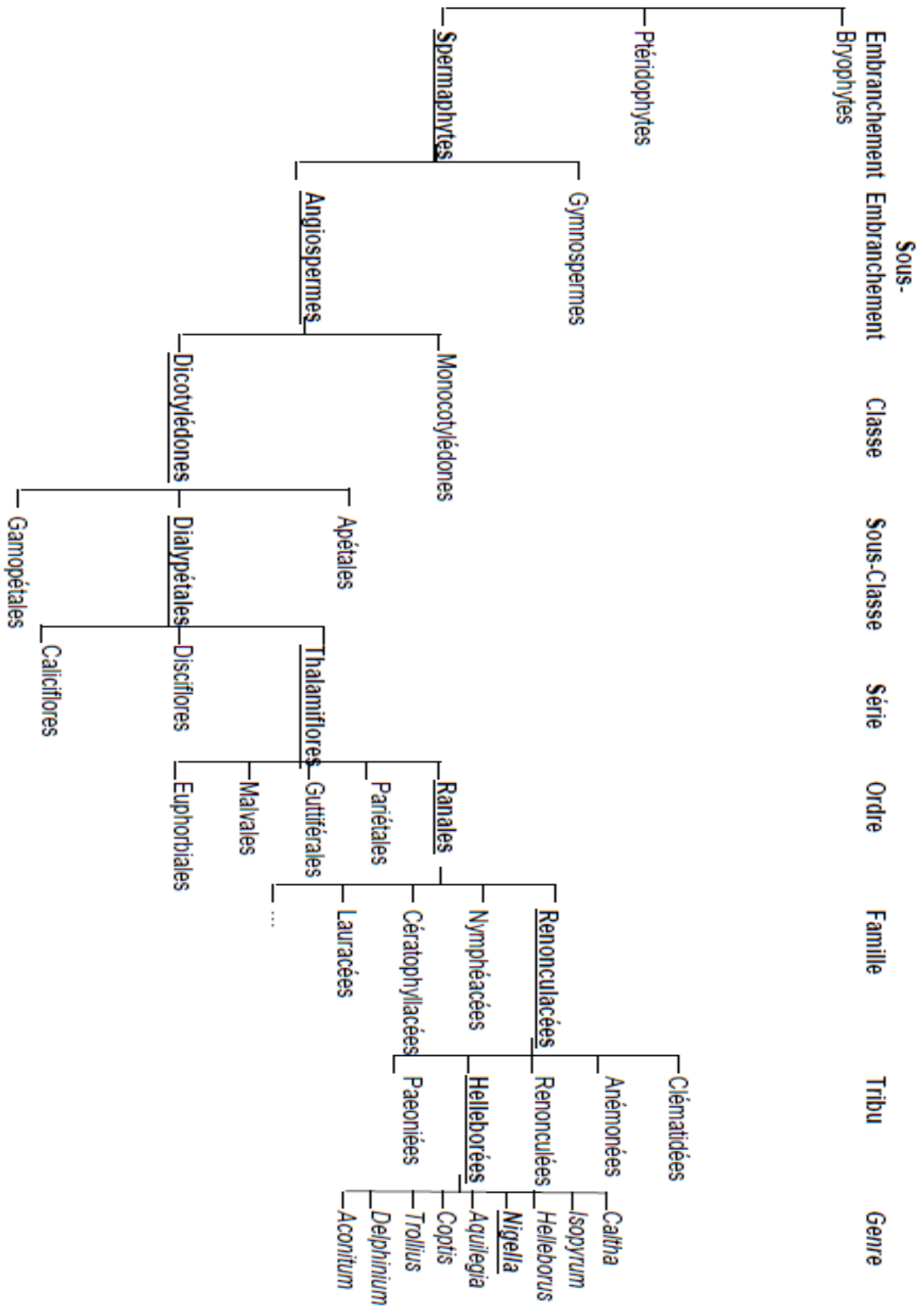


Figure 1 : Classification botanique selon Bentham et Hooker.<sup>4,5</sup>

Nom scientifique : *Nigella sativa*.

Noms communs : cumin noir, nigelle cultivée.

Classification botanique : famille des renonculacées (*Ranunculaceae*).

Hauteur : 20 cm à 70 cm

Couleurs des fleurs : Blanc, Rose, Violet, Bleu

Exposition souhaitée : Ensoleillée

Type de sol : Sableux, Sec, Drainé, Acide

Période de plantation : Mars, Avril, Mai



Période de floraison : Juin, Juillet, Août, Septembre. Figure 2 : Fleur de la plante *Nigella Sativa*<sup>6-7</sup>

Feuillage : Caduc

Entretien : Arrosage modéré, facile d'entretien.



Figure 3 : Graines de *Nigella Sativa*

Le fruit est une grande capsule composée de cinq follicules, chacun contenant de nombreuses graines de forme triangulaire, devenant noires pendant le mûrissement, la graine mesure environ 2,5 à 3 mm. Au printemps et après tout risque de gelé les graines sont semées sous une exposition ensoleillée sur une zone espacée, la nigelle est peu exigeante, elle se ressème d'elle-même si les graines seront laissées sur la plante.<sup>8</sup>

Pour la plantation du cumin noir, il faut :

- Un bon taux d'ensoleillement (18°C minimum).
- Un espacement de 20 cm entre chaque plan.
- Un sol sableux et sec, dans un endroit chaud et peu humide.

Des rangées espacées de 15 à 30 cm, et un labour moyen d'une profondeur de 40 à 50 cm, la nigelle possède un système racinaire pivotant. Avec 2 Kg de semis en moyenne par hectare, la dose suffisante par hectare est de 5Kg d'azote, de phosphates et de potassium (NPK), ou bien on utilise du fumier.<sup>9-10</sup>

La germination nécessite de l'obscurité, une profondeur des semis des graines est conseillée à 2 cm pour éliminer le risque d'une mauvaise levée.

Bien que la plantation soit aussi simple, la Nigelle exige une attention particulière, commençant par un sol drainé légèrement, détruire les mauvaises herbes par binage et ôter les fleurs fanées régulièrement. A mentionner que la floraison commence en juin après quatre mois de croissance végétative et se termine en septembre.

Pendant les étapes de floraison, il est préférable d'irriguer en vue d'éviter l'échaudage des graines, et afin de garantir un bon rendement par la suite.

La récolte aura lieu au milieu de l'été quand les follicules commencent à brunir ; après la récolte on sèche les plantes pour les préparer au battage.

En moyenne le rendement en graines est de 160 à 240 kg par hectare, soit 80 fois la quantité semée. Le meilleur rendement est obtenu en travaillant dans les conditions optimales (espacement de 15 cm et quantité de semis de 2 kg/ha). L'augmentation de nombre de plantes au-delà de seuil provoque une compétition négative entre les plantes qui engendre ensuite la chute du rendement.<sup>10</sup>

Les cultures de nigelles sont surtout ravagées par les pucerons noirs, ils attaquent l'extrémité des tiges ce qui provoque leur enroulement. Il faut alors traiter aux huiles minérales, pour détruire les œufs, ou à la bouillie nicotine.

L'Oïdium ou la maladie du blanc, est une mycose qui atteint les feuilles et qui se manifeste par des taches blanchâtres.

Des taches de couleur brun-rouille apparaissant à la base des plantes atteintes de mycose, un traitement par fongicide est alors nécessaire.<sup>9</sup>

La Nigelle ne doit pas être confondue avec la Nielle (*Agrostemma githago*), une autre plante messicole, redoutée pour sa toxicité.

*Nigella Sativa* se distingue de *N. Damascena*, très commune dans les jardins, par l'absence de feuilles multifides réunies en involucre immédiatement autour de la fleur puis du fruit.



Figure 4 : *Nigella Sativa* (à gauche), *N. Damascena* (à droite).

Tableau 1- Les différentes espèces du genre *Nigella*.<sup>3, 11-15</sup>

<i>N. assyriaca</i> Z.	<i>N. arvensis</i> L. (Nigelle des champs)
<i>N. amoena</i> S.	<i>N. bicolor</i>
<i>N. bucharica</i>	<i>N. carpatha</i>
<i>N. ciliaris</i>	<i>N. cilicica</i>
<i>N. corniculata</i> D.C.	<i>N. cretica</i>
<i>N. damascena</i> L. (Nigelle de Damas)	<i>N. degenii</i>
<i>N. deserti</i>	<i>N. divaricata</i>
<i>N. doerfleri</i>	<i>N. elata</i> B.
<i>N. fumariifolia</i> K.	<i>N. gallica</i> (Nigelle de France)
<i>N. glandulifera</i> (Nigelle de Chine)	<i>N. hispanica</i> (Nigelle d'Espagne)
<i>N. indica</i>	<i>N. lancifolia</i> H.
<i>N. latisecta</i> P.H.D.	<i>N. nigellastrum</i> (Garidelle fausse nigelle)
<i>N. orientalis</i> (Nigelle orientale)	<i>N. oxypetala</i> L.
<i>N. papillosa</i>	<i>N. persica</i>
<b><i>N. sativa</i> L</b>	<i>N. segetalis</i> B.
<i>N. stellaris</i> B.	<i>N. truncata</i>
<i>N. unguicularis</i> L.S.	<i>N. verrucosa</i>



Figure 5 : Représentation de différentes espèces du genre *Nigella*.

(a-b) *N. sativa* (c) *N. damascena* 'Cambridge Blue' (d) *N. arvensis* (e) *N. orientalis*

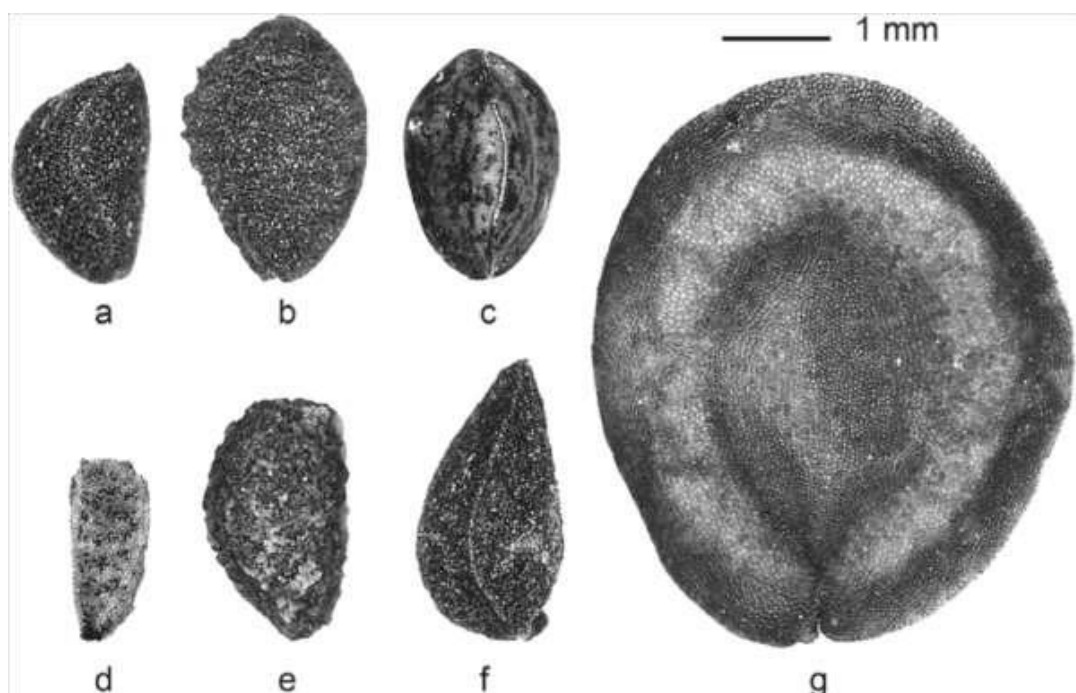


Figure 6 : Les graines de différentes espèces de Nigelles.<sup>16</sup>

(a / *N. arvensis* L., b/ *N. damascena* L., c/ *N. hispanica* L., d/ *N. integrifolia* Regel, e/ *N. nigellastrum* Willk., f/ *N. sativa* L., g/ *N. orientalis* L)

## II. HISTORIQUE

Utilisée depuis des époques très lointaines, la Nigelle a été connue sous plusieurs appellations relevant les pays dans lesquels elle était utilisée. Dans les pays du Maghreb, on l'appelle Al-Kamoun, As-Sinouj ou As-Sanouj. Les Anglais la nomme Black seed, Black cumin, Black caraway, Common Fennel flower, Nutmeg flower, Romain coriander. En France, elle a été réputée par Nigelle cultivée, Nigelle des jardins, Cumin noir, Faux cumin,



Quatre-épices, Toute-épice, Sésame noir, Herbe aux épices, Poivrette et Cheveux de Venu. De plus ancien dans la médecine gréco-romaine on l'appelait le Melathion (fleur noir) ou le Git, Hak Jung Chou dans la médecine chinoise. Le nom de Panacea (qui guérit tout) ou aussi meconagriamelan, on l'a attribué au vieux latin. Dans la péninsule arabique, on lui compte aussi plusieurs noms : AlKamoun Al-Aswad (le cumin noir [en référence à ses graines]), Al-Habbat As-Sawdah (la graine noire), Al-Habbat Al-Moubâarakah (la graine bénie) As-Samîrah, Ach-Chounîz, AlQahtah, At-Tachmizaj, Al-Jamachak, Al-Bachama. On la nommait Ach-chinqat dans l'Egypte Ancienne, Kalonji (énergie chaude) ou Al-KamounAl-Indî (le cumin indien) en Inde et au Pakistan.<sup>17</sup>

### III. PRODUCTION ET COMMERCE INTERNATIONAL

---

Au fil des années, la production basée sur les plantes aromatiques et médicinales ne fait qu'augmenter, certains pays sont passés de l'ordre consommateur à producteur-consommateur et arrivant jusqu'à exportateur parfois. Les pays producteurs sont principalement consommateurs de ces graines, épices, complément alimentaire ou même remède. Dans l'exemple de progression vers l'export, on peut citer la Turquie pays qui produisait juste pour sa population jusqu'à 2001, avant de commencer à l'exporter; elle exporte en moyenne 125 tonnes aujourd'hui.<sup>18</sup>

### IV. PROPRIETES MEDICINALES DE LA NIGELLE

---

- Un excellent complément alimentaire.<sup>19</sup>
- Des propriétés curatives importantes: diurétique, digestive, stimulante, galactogène (elle active la sécrétion de lait chez les femmes qui allaitent), antioxydante, analgésique et antiallergique.<sup>20</sup>
- Réduction du taux du sucre dans le sang et augmente la résistance à l'insuline.<sup>21</sup>
- Stimule le système immunitaire.<sup>22</sup>
- Anti- tumorale<sup>23</sup>, la graine noire est unique car elle peut aider à prévenir et à traiter le cancer grâce à divers mécanismes : Anti-prolifération, induction de l'apoptose, arrêt du cycle cellulaire, production d'un dérivé réactif de l'oxygène, anti-métastase, anti-



angiogénèse, cela en ce qui concerne l'utilisation de la graine directement pour usage interne ; pour d'autres utilisations externes ses extraits sont recommandés.

- Vertus anti inflammatoires et calmantes, une application locale ou massage diminue les douleurs articulaires, les maux de tête et le vertige.
- Soigne les problèmes de peau, les problèmes cutanés, traite aussi l'acné et améliore le teint.
- Soulage les douleurs dentaires et les rhumes.

Son effet drainant contribue à l'élimination des toxines, l'action anti-infectieuse de la Nigelle permet de soigner les problèmes respiratoires et renforce les voies contre toute agression extérieure.

A souligner que l'utilisation de la nigelle n'a aucun effet indésirable ni une contre-indication, aucune interaction avec d'autres médicaments ni des compléments alimentaires.

D'autres bienfaits sont reconnus tels que : les activités antibactériennes, antimicrobiennes, antivirales, antifongiques, et hypotensive.

Peu importe l'utilisation de la Nigelle, l'avis du médecin est primordial en cas de pathologie complexe.

## V. COMPOSITION CHIMIQUE DES GRAINES<sup>24</sup>

---

Les recherches sur la composition des graines de *N. sativa* ont débuté en 1880 avec Greenish, qui publia le premier rapport mentionnant la présence de 37% d'huiles et 4,1% d'éléments minéraux, elle contient 350 principes actifs, ce qui fit dire à un prophète : « La graine de nigelle soigne de tout, sauf de la mort. <sup>25</sup> »

Puisque notre travail repose sur l'exploitation de ces graines, nous allons développer encore d'avantage les différents constituants de cette graine de cumin noir.

Dans le tableau qui suit :

Tableau 2- Composition des graines de <i>Nigella sativa</i> Valeur nutritive pour 100 g <sup>26</sup>		
Eau : 6,46g	Cendres totale : 4,20g	Fibres : 6,03g
Protéines : 22,80g	Lipides : 31,16g	Glucides : 29,36g
Oligo-éléments		
Potassium : 808 mg	Phosphore : 543mg	Calcium : 570mg
Magnésium : 265mg	Sodium : 17,6mg	Fer : 9,70mg

D'autres composants secondaires ont développé. Parmi les plus importants d'entre eux, on cite les terpénoïdes, les polyphénols, les alcaloïdes, les acides organiques, les tanins, les saponines, mucilage, des fibres et des vitamines B (B1, B3, B6).<sup>27</sup>

Caractérisés par leurs effets antibactériens et antinéoplasiques, les terpénoïdes sont considérés comme les composés les plus importants par leur pouvoir à bloquer la prolifération des cellules cancéreuses. Le p-cymène (43,58 %), l' $\alpha$ -pinène (13,75 %), le limonène (2,55 %), le carvacrol (2,53 %), la thymoquinone (1,65 %) et les saponosides (génine, mélanthine,  $\alpha$ -hédérine) sont d'aussi moins importance que ceux cités précédemment.<sup>28-29</sup>

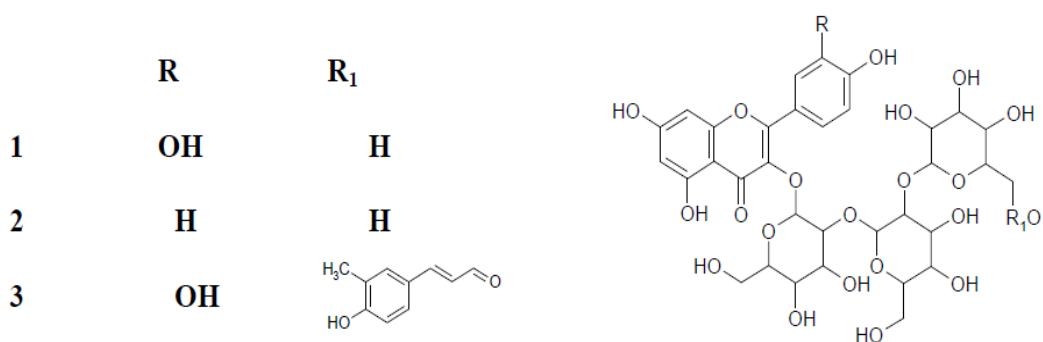
Tableau 3- Composition phénolique de la graine de *Nigella sativa*<sup>30,31</sup>

ACIDES PHENOLS		
ACIDES HYDROXYBENZOÏQUES acide gallique, acide vanillique, acide p-hydroxybenzoïque		ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES acide paracoumarique, acide trans-2- hydroxycinnamique, acide férulique
FLAVONOÏDES		
FLAVANOLS épicatéchol, catéchol (catéchine)	FLAVONE apigénine, amentoflavone, flavone	FLAVONOLS quercétol, kaempférol HETEROSIDES DE FLAVONOLS quercétine 3-glucoside ...

- Le p-cymène est un composé organique aromatique naturelle.
- L' $\alpha$ -pinène est un monoterpène aux propriétés antiseptiques. Il peut être utilisé en cas d'hypersécrétion bronchique.
- Le D-limonène est utilisé dans l'industrie agroalimentaire ainsi que dans l'industrie pharmaceutique pour parfumer les médicaments, notamment les alcaloïdes amers.
- Le carvacrol inhibe la croissance de plusieurs souches de bactéries, par exemple *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*.
- Les polyphénols prennent de plus en plus de l'importance grâce à leur effet bénéfique sur la santé.
- Les flavonoïdes très répandus chez les végétaux, responsables de la coloration des feuilles et des fruits, descendants de la famille des polyphénols, ils présentent une source importante d'antioxydants dans nos alimentations. Les trois principaux flavonoïdes isolés à partir de la *Nigella sativa* sont<sup>30</sup>:

1. quercétine 3-glycosyl (1 $\rightarrow$ 2) galactosyl (1 $\rightarrow$ 2) glucoside
2. kœmpférol 3-glycosyl (1 $\rightarrow$ 2) galactosyl (1 $\rightarrow$ 2) glucoside
3. quercétine 3-(6-feruloglucosyl) (1 $\rightarrow$ 2) galactosyl (1 $\rightarrow$ 2) glucoside.

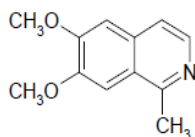
Leurs structures chimiques sont les suivantes :



- Les alcaloïdes ont, pour la plupart, des actions physiologiques et thérapeutiques à faibles doses. Ils deviennent cependant très toxiques à fortes doses.<sup>3</sup>

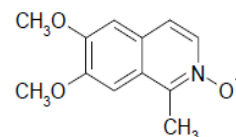
Les plus importants alcaloïdes de *N. sativa*, ont été isolés à partir des graines entre 1985 et 1995 :

Nigellicine, à noyau indazole.



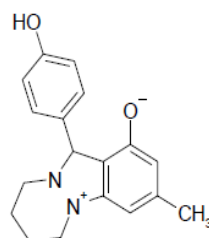
Nigellimine

Nigellimine, une isoquinoléine.



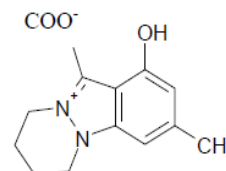
Nigellimine N-oxide

Nigellimine N-oxyde, dérivé N-oxyde de la nigellimine.



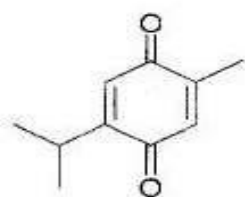
Nigellidine

Nigellidine, également un indazole.

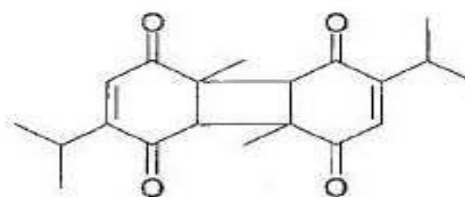


Nigellicine

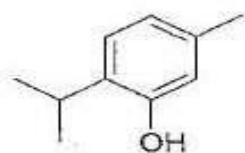
- La thymoquinone isolée principalement de *Nigella sativa* possède des propriétés supplémentaires à l'activité antioxydante, qui ont été rapportées dans divers types de maladies ; dans la plus importante nous soulignons son intervention sur la carcinogenèse (naissance d'un cancer à partir d'une cellule transformée par plusieurs mutations).<sup>32</sup>



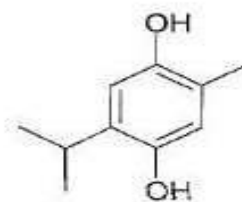
Thymoquinone



Dithymoquinone

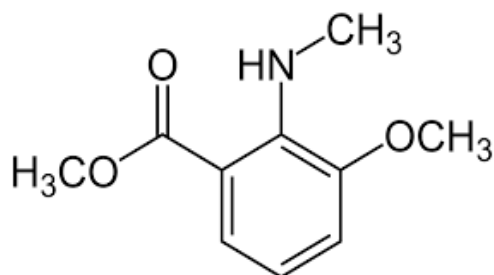


Thymol



Thymohydroquinone

- La nigellone a un effet antihistaminique et une action cicatrisante.



- 15 acides aminés qui font l'unité structurale de base des protéines.
- Tanins : propriétés pharmacologiques – astringents (provoquent la contraction des tissus et des vaisseaux sanguins et stimulent la coagulation du sang).

De la graine de Nigelle on peut aussi extraire des huiles qui ont diverses interférences dans plusieurs domaines. On développera par la suite la composition de chaque huile et son intérêt. Les graines de *Nigella sativa* renferment environ 0,4-2,5% d'huile essentielle, plus de 30% d'huiles fixes.

Le tableau suivant représente la composition d'huile fixe des graines de *N. sativa* selon l'origine.

Tableau 4- Composition (en pourcentage) des graines *N. sativa* en acides gras selon l'origine de l'échantillon.<sup>33</sup>

Acide gras	Origine des graines		
	Ethiopie	Inde	Syrie
Linoléique	58	54,68	54,13
Linoléinique	0,47	0,68	0,69
Palmitique	12,05	13,15	14,64
Oléique	23,46	25,67	24,51
Arachidique	0,2	0,25	0,2
Myristique	0,21	0,2	0,22
Eicosadiénoïque	2,87	2,39	3,02
Stéarique	2,7	2,97	2,6
Saturés totaux	15,18	16,57	17,66
Insaturés totaux	84,82	83,43	82,34

L'huile fixe présente quelques caractéristiques particulières, le ratio élevé d'acide Eicosadiénoïque sur l'acide Eicosamonoénoïque combiné à un taux élevé d'acides gras insaturés, sont spécifiques à l'huile de *Nigella sativa*. Cette caractéristique peut être utilisée pour identifier l'huile végétale vraie, les graines sont galactogènes et l'huile essentielle est un bon antioxydant.

## VI. PRODUITS A BASE D'HUILE DE NIGELLE

De nombreuses études soutiennent l'utilisation de *Nigella Sativa* en thérapeutique, pour but de valoriser ses potentialités qui ne sont pas encore concrétisées, après ses preuves dans diverses applications. Aujourd'hui cette plante est présentée par son huile sous la forme visqueuse ou en gélule revendiquant l'allégation « complément alimentaire à activité immunomodulatrice ».

Tous ses produits sont commercialisés par les leaders de ce domaine. Un aperçu montre une liste de produits avec la forme et les quantités qu'on peut trouver sur les marchés, la graine quant à elle se trouve dans toutes les épiceries.

Tableau 5- Liste des produits à base de Nigelle vendus sur internet.<sup>34</sup>

Huiles végétales biologiques de Nigelle	
Abiessence	Flacon 50 et 100 mL
Centiflor	Flacon 100 mL
Centifolia	Flacon 100 mL
Emma Noel	Flacon vaporisateur de 50 mL, enrichie en vitamine E
Ferme des peupliers	Flacon en verre 250 mL
Herbes et Tradition	Flacon 50 mL
Hevea	Flacons 50 et 200 mL, composition : acide linoléique, acide oléique, acide palmitique, acide stéarique.
Huiles et baumes	Flacon 30 mL
Hyteck	Flacons de 100 et 250 mL, et en berlingot de 10 mL
Karawan	Flacon 50 mL, composition : huile de nigelle, tocophérol
Melvita	Flacon 50 mL
Natessance	Flacon de 50 mL, huile de nigelle, vitamine E naturelle
Pranarom	Flacons 50, 100 mL et 1 L.
Sophery	Flacon 50 mL
Terrocean	Flacon 200 ml

Formes solides, capsules	
Abc de la nature	Boîtes de 60, 100 et 200 capsules en gélatine de poisson, d'huile végétale vierge première pression à froid dosées à 500 mg
Bioluxe	Pilulier de 120 capsules huileuses dosées à 500 mg d'huile de nigelle (procédé de la tunique de la gélule : aqua-marine exclusivement)
Biovedas	Boîte de 200 capsules dosées à 500 mg d'huile de nigelle, gélatine et glycérine : 200 mg
Boutique nature	Pilulier de 90 capsules d'origine marine dosées à 500 mg d'huile de nigelle, tunique : gélatine de poisson, glycérine, eau, amidon
Chifa	Pilulier de 60 capsules dosées à 500 mg d'huile de nigelle
Dieti Natura	Boîtes de 60 et 200 capsules dosées à 500 mg d'huile de nigelle, capsule gélatine et glycérine (200 mg)
Emma Noel	Capsules 515 mg comprenant 73,25 % d'huile vierge de nigelle biologique, 17,23 % de gélatine de poisson, 7,34 % de glycérol végétal, 1,08 % d'eau, 0,74 % d'huile vierge de germe de blé de première pression à froid, auxiliaire technologique : lécithine de soja
Floralpina	Capsules d'huile de nigelle
Ombelle Nature	Boîtes de 60 et 200 capsules dosées à 500 mg d'huile de nigelle
Terrocean	Boîtes de 200 capsules de 782 mg

CHAPITRE II  
METHODES D'EXTRACTION



## I. GÉNÉRALITÉS SUR LES TECHNIQUES D'EXTRACTION

---

---

### Introduction

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme selon diverses techniques.

Dans les domaines de la chimie des substances naturelles, la chimie analytique et de la chimie thérapeutique, l'extraction de molécules organiques est une phase primordiale.

En effet, si les hommes se soignent, utilisent des colorants, des parfums, des arômes, et des extraits de produits naturels depuis la haute Antiquité à l'aide de plantes, c'est tout simplement parce qu'elles contiennent des molécules présentant une activité thérapeutique spécifique.

### I.1 INTÉRÊT DE L'EXTRACTION

---

---

Le but de l'extraction est d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un organisme. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments peut passer par l'étude de ces substances naturelles et si une molécule se trouve être performante dans un domaine précis, elle pourra faire l'objet d'une commercialisation sous forme de médicament.

### I.2 LES MÉTHODES D'EXTRACTION

---

---

Il existe plusieurs méthodes d'extraction dont certaines ont été développées par les artisans parfumeurs bien avant l'essor de la chimie moderne.

Parmi ces méthodes d'extractions on peut citer :

---

#### I.2.1 DÉCOCTION (INFUSION)

---

On laisse le végétal en contact avec un liquide, dans laquelle le liquide est porté à ébullition puis refroidi. Les espèces chimiques contenues dans la matière végétale vont se solubiliser.

---

#### I.2.2 MACÉRATION

---

La macération est un procédé qui consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide froid pour en extraire les composés solubles.

---

### I.2.3 HYDRODISTILLATION OU ENTRAINEMENT À LA VAPEUR

---

L'hydrodistillation est la méthode la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles. Elle consiste à entraîner les composés volatiles des produits naturels avec la vapeur d'eau.

---

### I.2.4 DISTILLATION

---

C'est une technique qui permet de séparer les différentes espèces chimiques contenues dans un mélange liquide.

---

### I.2.5 EXTRACTION PAR SOLVANT

---

L'extraction par solvant consiste à dissoudre la substance contenant l'huile essentielle recherchée dans un solvant, puis à éliminer le solvant et récupérer l'huile essentielle. Les molécules organiques étant solubles dans les solvants employés, il est particulièrement aisé de séparer les constituants recherchés.

---

#### I.2.5.1 TYPES D'EXTRACTION PAR SOLVANT

---

Il existe plusieurs types d'extraction par solvant.

---

#### I.2.5.2 EXTRACTION DIRECTE

---

L'espèce chimique ou l'huile est extraite directement d'un produit naturel par macération puis filtration.

---

#### I.2.5.3 EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE

---

L'extraction liquide-liquide est l'une des techniques les plus anciennes utilisées pour la préparation d'échantillons. C'est une opération fondamentale de transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles, sans transfert de chaleur. Cette technique permet d'extraire une ou plusieurs substances dissoutes dans un solvant, à l'aide d'un autre solvant, appelé solvant d'extraction, dans lequel elle est plus soluble. Le solvant initial et le solvant d'extraction ne doivent pas être miscibles. L'extraction liquide-liquide est réalisée par le contact intime du solvant avec la solution dans des appareils destinés à mélanger les deux phases (ampoules, colonnes, mélangeurs). La séparation des phases s'obtient par décantation gravimétrique ou centrifuge.

### - Principe

Du fait que la température d'ébullition de l'eau est élevée, elle ne s'évapore pas facilement, donc l'espèce chimique est difficilement récupérable si elle est en solution dans l'eau. Dans ce cas, il faut utiliser un solvant organique qui solubilise la substance (beaucoup plus que dans l'eau), donc elle va passer de l'eau au solvant organique. Il faut que l'eau et le solvant organique ne soient pas miscibles. L'extraction liquide-liquide est l'une des opérations les plus pratiquées dans un laboratoire de chimie organique. Elle consiste à transférer un composé d'une phase aqueuse à une phase organique ou inversement, en utilisant pour cela deux solvants (l'un aqueux et l'autre organique), non miscibles, mis en contact intime. En pratique, cette extraction est une étape de préparation d'échantillons très utilisée mais présentant des inconvénients lorsqu'elle est pratiquée avec une ampoule à décanter :

- Multiplication des étapes d'extraction pour obtenir un rendement optimum.
- Utilisation d'importants volumes de solvants organiques dont les coûts de recyclage deviennent de plus en plus chers.
- Difficulté d'émulsion qui ne permet pas la récupération de 100% de l'extrait.
- Traces d'éluant dans le raffinat qui nécessite un traitement supplémentaire de l'échantillon avant l'étape d'évaporation.

Il existe deux types d'extraction liquide-liquide :

- Extraction liquide-liquide discontinue qui peut être réalisée grâce à des ampoules à décanter.
- Extraction liquide-liquide continue qu'on peut utiliser lorsque le produit à isoler est relativement soluble dans la phase à extraire. Le solvant est recyclé et passe continuellement à travers la solution à extraire.

#### I.2.5.4 EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE

L'extraction solide-liquide est un phénomène lent qui permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide.

Dans les laboratoires de chimie on utilise souvent des appareils plus efficaces, comme l'extracteur de Soxhlet ou l'extracteur de Kumagawa.

Les laboratoires de chimie analytique et les entreprises qui fabriquent des parfums utilisent des pilotes d'extraction solide-liquide discontinue (soxhlet) pour augmenter leurs rendements d'extraction et gagner plus de temps.

## II. DESCRIPTION DE PILOTE MP1035



Service : 230 V / 50 HZ  
/ monophasé : 3KW.

Eau froide 20 °C/ 3  
Bars/ Egout 0 - 6 m<sup>3</sup>/h.

Dimensions : 1,80 m X  
0,85 m X 2,96 m.

Poids : 180 kg.

Figure 1 : Pilote d'extraction solide-liquide discontinue et distillation discontinue MP1035

### II.1 PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

L'extraction solide - liquide est un procédé semi-continu, couplant une distillation avec une cartouche de type « Soxhlet » contenant le produit solide imprégné d'un principe actif (soluté) à extraire par dissolution dans un solvant chaud.

La colonne de distillation génère des vapeurs de solvant qui sont condensées ; ce solvant pur et chaud alimente la cartouche contenant le solide inerte et le soluté.

Lorsque la cartouche est pleine, la solution obtenue (solvant et soluté) se vide automatiquement par siphonage (lixiviation) puis retourne dans le bouilleur où le solvant est de nouveau porté à l'ébullition. La lixiviation peut également être opérée par passage continu du solvant ou par vidanges manuelles successives.

Le solvant peut être également alimenté en une seule « passe » pour l'infusion puis l'extrait obtenu est soutiré manuellement<sup>35</sup>.

## II.2 EQUIPEMENT

---

- Bouilleur en verre borosilicaté, chauffage électrique, équipé d'une sécurité niveau mini et d'une sécurité température maxi ; volume utile 6 litres.
- Réfrigérant pour prise de pression différentielle.
- Colonne en verre borosilicaté, en deux éléments avec garnissage en inox 316L.
- Deux plateaux de recentrage en inox 316L, équipés chacun de vanne d'échantillonnage et de prise de température.
- Tête de colonne en verre borosilicaté, avec prise de température, équipée d'un clapet timer pour contrôler le taux de reflux.
- Condenseur vertical en inox 316L,
- Réfrigérant du distillat en inox 316L.
- Deux recettes du distillat en verre borosilicaté.
- Cartouche d'extraction, type « Soxhlet », en verre borosilicaté avec ouverture rapide et poche montée sur un support en inox 316L.
- Tuyauteries de liaison en inox 316L pour le procédé et en PVC armé pour le fluide de refroidissement.
- Charpente support en tubes inox 304L et noix aluminium.

## II.3 INSTRUMENTATION

---

- Alimentation d'eau de refroidissement du condenseur équipé d'un débitmètre à flotteur avec son robinet de réglage et d'un contrôleur de circulation d'eau pour arrêt du chauffage par manque de refroidissement.
- Mesure de perte de charge de la colonne par manomètre différentiel en « U ».
- Armoire de commande et de contrôle, IP55, équipée d'un arrêt d'urgence, des boutons de mise en fonctionnement et des interfaces suivantes :
- Timer électronique contrôlant le clapet de la tête de colonne.
- Régulateur de commande du chauffage du bouilleur.
- Deux indicateurs numériques de température de 7 sondes type Pt100  $\Omega$ .

### III. MISE EN ROUTE GÉNÉRALE

---

Avant toute manipulation, il convient de fermer toutes les vannes d'arrêt et toutes les vannes de réglage de l'installation.

- Vérifier que l'interrupteur (marche/arrêt) situé sur l'armoire électrique est sur la position « arrêt »,
- Mettre sous tension l'armoire électrique du pilote puis mettre en route l'armoire électrique du pilote par le bouton « marche »,
- Ouvrir la vanne générale d'alimentation d'eau de refroidissement,
- Régler le débit d'alimentation de l'eau de refroidissement du condensateur par la vanne VR1 à 250 L/h environ,
- Régler le débit d'alimentation de l'eau de refroidissement de l'échangeur du circuit distillat et du piège de la cartouche d'extraction par la vanne de réglage VR2, si nécessaire,
- Desserrer les deux raccords coulissant de la canne du siphon à la main,
- Régler, en l'absence de toute circulation de solvant ou de solution, la hauteur de la canne du siphon à une hauteur suffisante (environ 20 cm au-dessus du niveau minimum) pour dégager la tubulure coulissante dans la vanne V4,
- Serrer les raccords de la canne du siphon à la main,
- Fermer la vanne V4,

Le pilote est prêt pour une manipulation.



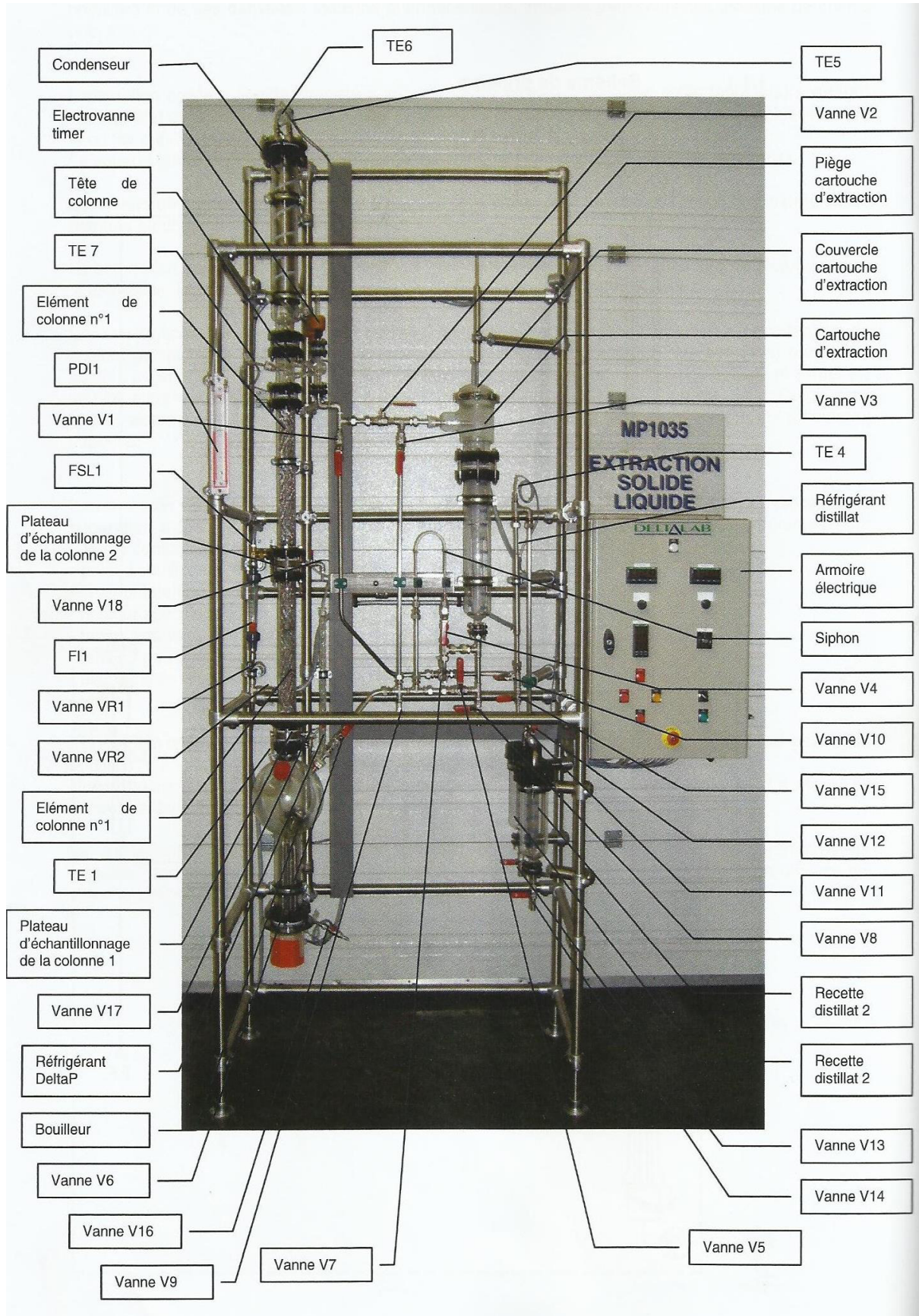


Figure 2 : Schéma représentant les différentes parties du pilote.

#### IV. REMPLISSAGE DES PRODUITS

---

Il convient de remplir le bouilleur par le solvant de travail.

Dans notre étude on a utilisé deux types de solvants :

- Le n-hexane pour extraire l'huile fixe contenue dans les graines de Nigelle.
- Un mélange de solvant « éthanol-eau » 80 :20 (V/V) pour l'extraction de l'extrait brut.
- Lorsque le bouilleur est plein ou suffisamment chargé, on ferme le bouchon frontal de remplissage du bouilleur avec son joint d'étanchéité,
- Ouvrir la bride du couvercle de la cartouche d'extraction,
- Enlever le couvercle de la cartouche d'extraction,
- Dévisser les raccords de la tubulure d'alimentation supérieure de solvant de la cartouche d'extraction à la main,
- Repousser la tubulure d'alimentation supérieure de solvant de la cartouche d'extraction vers la vanne d'alimentation supérieure de solvant de manière à dégager complètement la tête de la cartouche d'extraction,
- Positionner le sac de produit solide propre et sec sur son support métallique,
- Remplir du produit solide d'étude (les graines de Nigelle sèches et broyées), le sac ainsi préparé,
- Positionner le sac contenant le produit solide à étudier avec son support métallique dans la cartouche d'extraction,
- Positionner la tubulure d'alimentation supérieure de solvant de la cartouche d'extraction vers celle-ci de manière à alimenter le solvant au centre de la cartouche,
- Visser les raccords de la tubulure d'alimentation supérieure de solvant de la cartouche d'extraction à la main,
- Positionner à nouveau le couvercle de la cartouche d'extraction à sa place,
- Fermer la bride du couvercle de la cartouche d'extraction.

#### V. EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE

---

- Mettre en route le pilote (déjà vu précédemment),
- Ouvrir les vannes V2, V4 et V6 successivement,
- Mettre en marche le chauffage du bouilleur par le bouton « marche » situé sur l'armoire électrique,



- La puissance de chauffage du bouilleur est réglée à la valeur désirée par le régulateur correspondant,
- Les températures augmentent ; la valeur de la perte de charge de la colonne est indiquée par le manomètre en U en mm de colonne d'eau,
- Lorsque les vapeurs du solvant atteignent la tête de colonne, elles sont condensées, puis refluent dans la colonne,
- Mettre en marche le timer de prélèvement de distillat par le bouton « marche/arrêt » situé sur l'armoire électrique,
- Le solvant condensé remplit la cartouche d'extraction jusqu'au niveau supérieur de la sur verse,
- Lorsque la solution contenue dans la cartouche d'extraction déborde, elle retourne vers le bouilleur,
- Le solvant condensé remplit à nouveau la cartouche d'extraction pour un nouveau cycle remplissage-siphonage.

## VI. ARRÊT DE L'INSTALLATION

---

- Arrêter le timer de prélèvement du distillat par le bouton « marche/ arrêt » situé sur l'armoire électrique sur la position « arrêt »,
- Arrêter le chauffage du bouilleur par le régulateur correspondant,
- Fermer la vanne VR1et VR2 lorsque les températures de la colonne sont redevenues normales,
- Fermer la vanne générale d'alimentation d'eau de refroidissement,
- Arrêter l'armoire électrique par le bouton « arrêt »,
- Mettre hors tension l'armoire électrique par l'interrupteur général « marche/arrêt » général sur la position « arrêt ».

## VII. MAINTENANCE ET ENTRETIEN

---

Il est nécessaire de vidanger toute l'installation en fin de chaque séance (uniquement lorsque les produits qui seront utilisés lors de la prochaine séance seront identiques).

Néanmoins il est conseillé de vidanger le bouilleur, la cartouche d'extraction et les recettes du distillat.

Vérifier que le coffret électrique est hors tension.

Contrôler systématiquement le bon fonctionnement des sécurités.

Vérifier régulièrement l'étanchéité de l'installation, si les joints d'étanchéité sont endommagés ils seront changés avant réutilisation de pilote.

Toutes les parties de l'installation peuvent se nettoyer avec un chiffon doux légèrement imbibé de solvant type alcool ou de l'eau distillée.

En cas d'arrêt prolongé, toute l'installation est vidangée.

En cas de risque de sécurité au sein de l'établissement, débrancher l'appareil.<sup>36</sup>

# CHAPITRE III

## MATERIELS ET METHODES

## Introduction

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire des technologies de séparation et de purification (LTSP) de l'Université de Tlemcen, dans le but d'extraire et d'identifier la composition chimique des extraits obtenus via le pilote MP1035.

## I. MATÉRIEL VÉGÉTAL

---

Cette étude a été réalisée sur la graine *Nigella sativa*. La récolte des graines de nigelle a été faite au mois de septembre 2017 dans la pépinière de Timsadart, région de Ain Ghoraba-wilaya de Tlemcen.

Le matériel végétal (les graines) a été séché à l'ombre et à température ambiante. Pour obtenir une meilleure extraction, il est conseillé d'utiliser le matériel végétal sec afin d'éliminer tout risque de dégradation des composés antioxydants sous l'action des enzymes du matériel végétal frais.

Le matériel ainsi séché a été broyé finement à l'aide d'un broyeur électrique (moulinette), puis tamisé à travers trois tamis (1 mm, 400  $\mu\text{m}$ , 200 $\mu\text{m}$ ) afin de pouvoir récupérer la poudre de granulométrie entre (400 et 200  $\mu\text{m}$ ), compatible aux pores de la cartouche du pilote.

Le pilote est alors prêt pour une extraction.

## II. EXTRACTION DES HUILES

### II.1 EXTRACTION DE L'HUILE FIXE

---

La méthode suivie pour l'obtention de l'huile est celle de Soxhlet. Une masse de 200g des graines de nigelle préparées précédemment subit une extraction par un solvant apolaire (n-Hexane 95% fourni par Biochem) pour un rapport 1/10 (p/v) pendant 4 heures (25 cycles) pour assurer l'épuisement de toute substance apolaire contenue dans les graines. Le maximum de solvant est récupéré par distillation sur le même pilote. La quantité d'hexane restante dans le bouilleur est récupérée puis évaporée à l'aide d'un rotavapor (BÜCHI R200). Le produit final est de couleur rouge à marron, de forme fluide et d'odeur épicée.

## II.2 EXTRACTION DE L'EXTRAIT BRUT

---

A la fin de l'extraction par le solvant polaire, les graines ont été laissées à sécher la nuit avant d'être réutilisées pour une deuxième extraction par un solvant polaire (éthanol-eau) 80/20 (v/v) afin d'extraire les composés polaire et moyennement polaire ; le protocole indique de faire l'extraction pendant un temps plus important que le premier, environ 6 heures (37 cycles). A la fin du procédé et après distillation, l'extrait alcoolique à son tour est mis au rotavapor pour éliminer toute trace de solvant. Le produit ainsi obtenu a une couleur brun foncé et de forme pâteuse et une odeur prononcée.

## II.3 L'EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE

---

Lorsqu'on porte l'eau distillée à l'ébullition, les vapeurs d'eau pénètrent dans les graines et cassent les cellules végétales libérant les molécules volatiles. Les vapeurs sont ensuite refroidies et récupérées dans un flacon. L'éther diéthylique solubilise l'huile essentielle et non miscible avec l'eau, nous avons opté pour une extraction liquide-liquide. Par décantation on arrive à séparer les deux phases, la phase organique contenant l'huile essentielle est récupérée, le solvant est ensuite évaporé, on récupère l'huile essentielle.

## III. RENDEMENT

---

Il est possible de déterminer le rendement des extraits par rapport à la matière sèche, en calculant pour chaque extrait la différence entre la masse de graines initiales et celle de produit, sur la masse initiale. Le rendement est calculé selon la relation suivante :

$$R(\%) = \left(1 - \frac{\text{masse}_{\text{initiale}} - \text{masse}_{\text{produit}}}{\text{masse}_{\text{initiale}}}\right) \times 100$$

## IV. DOSAGE DES POLYPHÉNOLS TOTAUX

---

Le protocole le plus approprié pour l'évaluation des composés phénoliques contenus dans les extraits obtenus, basé sur le pouvoir réducteur de ces composés, sur le mélange d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) du réactif de

Folin-Ciocalteu. Un complexe de couleur bleu est formé, la lecture est effectuée sur un appareil de UV-VISIBLE à la longueur d'onde de 750nm.<sup>37</sup>

- Protocole

2 mL de solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée est mélangée avec 100 µL de l'extrait (à diluer s'il est trop concentré). On agite le mélange par un vortex pendant 5 minutes, 100 µL du réactif de Folin-Ciocalteu (fourni par Prolabo) à 1N sont ensuite ajoutés au mélange, le tout est laissé au repos durant 30 minutes à température ambiante avant effectuer la lecture à 750 nm contre un blanc contenant tous les réactifs sauf l'extrait à analyser.

L'absorbance lue à 750 nm correspond à la quantité des polyphénols présents dans les extraits.

Une courbe d'étalonnage d'acide gallique est réalisée parallèlement dans les mêmes conditions comme témoin, pour servir à exprimer les résultats obtenus en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait brut (GAE/g E).<sup>38</sup>

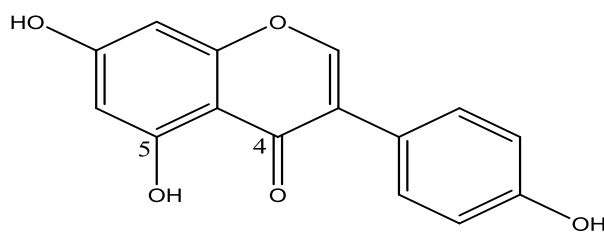


Figure 1 : Appareil UV-Visible

## V. DOSAGE DES FLAVONOÏDES TOTAUX

---

La méthode de trichlorure d'Aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes, l'apparition de la couleur jaune due à la fixation des ions  $Al^{3+}$  sur les atomes d'oxygène des carbones 4 et 5 des flavonoïdes comme l'indique la structure ci-dessous, la lecture s'effectue sur un appareil UV-VISIBLE à 415 nm.



- Protocole

La quantification des flavonoïdes est réalisée par la méthode colorimétrique.<sup>39</sup>

500  $\mu\text{L}$  de l'extrait sont ajoutés à 2mL d'eau distillée suivi de 150  $\mu\text{L}$  d'une solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 15%. Après 6 minutes, 150  $\mu\text{L}$  de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 10% sont ajoutés au mélange ; le tout est laissé pendant 6 minutes sans agitation, puis 2mL d'hydroxyde de sodium à 4% sont ajoutés aux tubes et le volume final est complété immédiatement par 200  $\mu\text{L}$  d'eau distillée.

La lecture a été réalisée à 415 nm après 15 minutes ; le blanc est préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol.

La courbe d'étalonnage est réalisée parallèlement dans les mêmes conditions de travail en utilisant la quercétine comme contrôle positif.

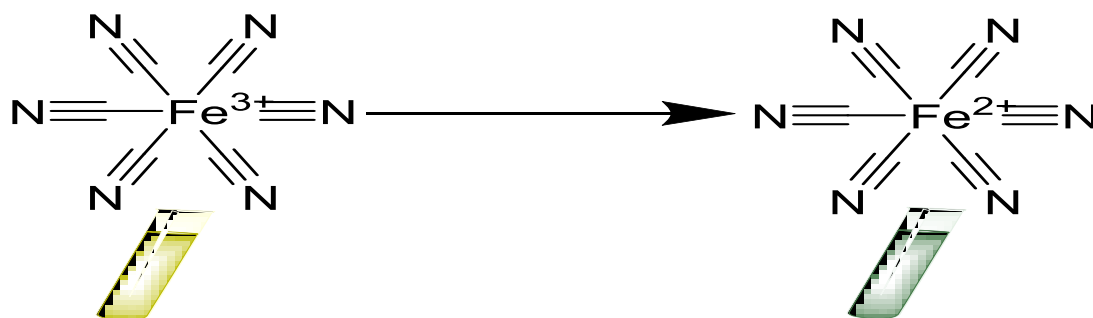
Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine par gramme d'extrait brut (QRE/g E).<sup>39</sup>

## VI. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

### VI.1 ETUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

#### VI.1.1 RÉDUCTION DU FER : METHODE DE FRAP (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est lié principalement à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice de nos extraits se résume par la capacité de réduire le fer (III) présent dans le complexe de ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) en Fe (II). L'absorbance est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits testés. La lecture s'effectue à 700 nm sur un appareil UV-VISIBLE.<sup>40</sup>



- Protocole :

1 mL de l'échantillon à différentes concentrations est mis dans un mélange de 2,5 mL de solution tampon phosphaté (pH=6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. On laisse les tubes dans l'étuve à 50°C. Après 20 minutes d'incubation, les tubes sont refroidis à température ambiante ; pour stopper la réaction 2,5 mL de l'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés, puis on centrifuge à 3000 rpm pendant 10 minutes.

Un volume de 2,5 mL est prélevé du surnageant pour l'ajouter à 2,5 mL d'eau distillée et 500  $\mu$ L d'une solution de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (0,1%). Le mélange est analysé par spectrométrie UV-Visible, contre un blanc à 700 nm.<sup>41</sup>

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif en gardant les mêmes conditions opératoires.

Les résultats sont représentés sur un diagramme qui indique l'absorbance pour chaque concentration des extraits et l'acide ascorbique.

---

#### VI.1.2 PIÉGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH (2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL)

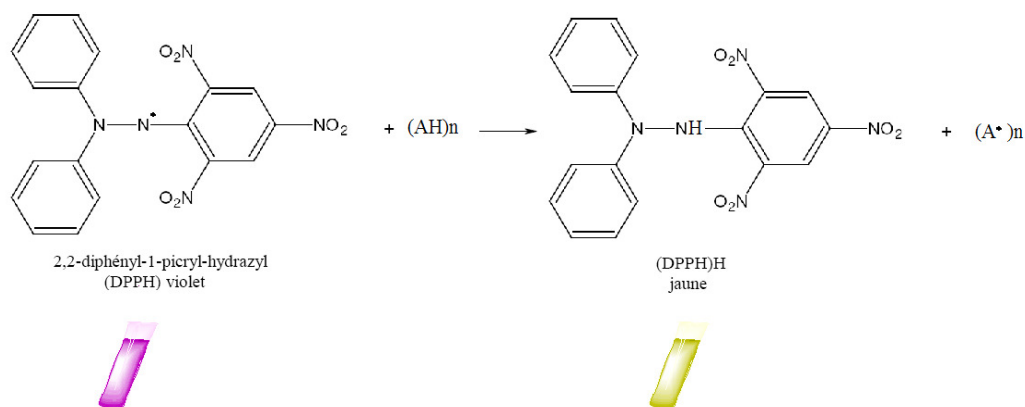
---

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical très utilisé dans les tests d'activité antioxydante, ceci est dû à sa stabilité comme radical et aussi comme molécule en acceptant un électron ou un radical hydrogène. Dans notre travail l'effet antioxydant est traduit par la possibilité de donner un radical hydrogène, et ceci est observé par le changement de couleur initiale du violet vers le jaune ; la capacité réductrice sur le DPPH est lue à son absorbance maximale située à 515 nm.



Le DPPH est solubilisé dans le méthanol avant d'être utilisé, puis conservé dans une fiole opaque à l'abri de toute source de lumière pour éviter son oxydation.

L'absorbance maximale de DPPH est vérifiée avant son utilisation, elle doit être comprise entre (0,40 et 1,0).<sup>42</sup>



- Protocole :

1 mL de chaque extrait à différentes concentrations sont préparés dans du méthanol, et ont été ajoutés à un volume égal de la solution de DPPH fraîchement préparée. Les tubes ont été agités par vortex et maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes. Un blanc est préparé contenant l'extrait sans DPPH, l'absorbance des échantillons est lue à la même absorbance maximale de DPPH seul (515 nm).

Pour le standard, on se référence à l'acide ascorbique comme dans la manipulation de FRAP.

- Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé à partir de l'équation suivante :

$$I\% = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

$A_S$  = absorbance du contrôle négatif

$A_T$  = absorbance du test

- La concentration des extraits nécessaire pour piéger 50% de radicaux libres, est calculée à partir de l'équation de régression linéaire obtenue en traçant les pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations

d'échantillons préparés. Cette concentration est connue sous le terme (Efficient concentration 50 EC50, ou concentration inhibitrice 50 IC50).<sup>43</sup>

- Plus la valeur de 50 IC50 est petite, plus l'effet antioxydant est important.

## VI.2 ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

---

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile de *Nigella sativa*, deux techniques sont réalisées au laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de Tlemcen sur une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à gram-négatif robuste, très résistante à de nombreux antiseptiques, souvent fréquentée dans le milieu hospitalier, responsable d'infections nosocomiales. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables. Elle est réputée par la facilité de la contagion et sa rapidité d'adaptation aux attaques médicamenteuses ; en outre des tests ont pu montrer qu'elle est formatrice de biofilm.<sup>44</sup>

Les différents extraits des graines de *Nigella sativa* présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de différentes souches de bactéries de gram-positif et de gram-négatif.<sup>45</sup>

---

### VI.2.1 ACTIVITÉ ANTIADHÉSIVE

---

Des morceaux de 1 cm<sup>2</sup> de sonde urinaire préparés et stérilisés sont mis dans des tubes contenant 1mL de la suspension bactérienne à une DO de 0,1, et 1mL d'huile de Nigelle à des concentrations de 50%, 40%, 30% diluée dans le DMSO, sont incubés à 37°C pendant 24H. Les morceaux sont récupérés, lavés abondamment à l'eau distillée stérile puis placés dans 1mL d'eau physiologique. La sonication est effectuée 3 fois à l'aide de l'ultrason model WiseClean WUC-D06H pendant 5 minutes intercalée par un passage de 20 secondes au vortex. Une série de dilutions est effectuée pour chaque échantillon, puis ensemencée sur gélose nutritive. Le dénombrement des colonies est réalisé après 24h d'incubation à 37°C.<sup>46</sup>

---

### VI.2.2 ACTIVITÉ ANTI-BIOFILM

---

Après la formation du biofilm sur des morceaux de 1cm<sup>2</sup> de sonde urinaire, les morceaux récupérés, rincés avec l'eau distillée stérile et placés dans des tubes contenant l'huile de Nigelle à des concentrations de 50% 30% 20% dilué dans le DMSO, puis incubés à 37°C pendant 24h.

Après l'incubation, les morceaux sont rincés puis traités par passage successif sur l'ultrason et vortex pour détacher les bactéries adhérentes sur la sonde. Une série de dilutions est effectuée pour chaque échantillon, puis un ensemencement sur gélose nutritive. Le dénombrement des colonies est réalisé après 24h d'incubation à 37°C.<sup>47</sup>

## VII. ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE

---

### VII.1 DENSITÉ

---

La densité relative d'huile de Nigelle est effectuée par un densimètre, il est de forme d'un pycnomètre de 1 mL de volume et de masse connue avec précision.

Le densimètre est nettoyé et séché, une pesée est effectuée plusieurs fois jusqu'à la stabilité de la valeur lue sur la balance.

Le densimètre est ensuite rempli d'huile de Nigelle, puis fermé par son bouchon, l'excès d'huile qui déborde sur les parois est essuyé avant d'effectuer la pesée. De même que précédemment la pesée est répétée jusqu'on arrive à une valeur stable.

---

### VII.2 INDICE DE RÉFRACTION

---

L'indice de réfraction est lu à partir d'un refractomètre de prisme d'éclairage.

Le refractomètre est dirigé vers une source de lumière et étalonné avec de l'eau distillée. Une quantité suffisante d'huile est déposée sur la face horizontale du prisme de référence. En regardant dans l'oculaire, on agit sur les deux moletés (le grand pour amener dans le champ de vision la limite de séparation des deux zones claire et obscure, le petit pour supprimer les colorations que pourrait présenter la limite de séparation des zones).

Une fois la vision nette, on peut lire la valeur de l'indice de réfraction jusqu'à la quatrième décimale.

Une fois la lecture est faite, il est recommandé de nettoyer soigneusement les deux prises avec le papier Joseph.

Si la lecture est effectuée à une température légèrement différente à 20°C, une formule empirique permet d'évaluer exactement l'indice de réfraction à 20°C.

$$n^{20} = n^t + 0,00045(t-20)$$

### VII.3 INDICE D'ACIDE

Afin de déterminer si un acide gras n'est pas détérioré, on calcule la concentration d'acides libres qu'il contient. Il est déterminé par la quantité de potasse (en mg) nécessaire pour neutraliser tous les acides libres ; un acide gras détérioré est lié à la transformation des triglycérides en glycérol.

Cet indice est déterminé par un dosage en retour, les acides libres réagissent avec la quantité connue de potasse ajoutée, l'excès de potasse est ensuite dosé par une solution de HCl de concentration connue avec précision, l'indice d'acide est alors calculé comme suit :

$$I_A = \frac{(V_T - V_E) \times C_{HCl} \times M_{KOH}}{m}$$

$I_A$  : indice d'acide

$V_T$  : volume de solution d'acide chlorhydrique utilisé pour le témoin en mL.

$V_E$  : volume de solution d'acide chlorhydrique utilisé la solution d'échantillon.

$C_{HCl}$  : concentration d'acide chlorhydrique donnée.

$M_{KOH}$  : masse molaire du KOH en g/mol.

$m$  : masse d'huile exactement pesée en mg.

### VII.4 INDICE DE SAPONIFICATION

L'indice d'acide correspond à la masse en mg de KOH nécessaire pour neutraliser les acides gras estérifiés contenus dans 1g de matière grasse.

Si un corps gras est porté à ébullition en présence de potasse, les esters se saponifient. Il s'agit d'une réaction totale et lente ; elle nécessite quarante à soixante minutes à l'ébullition douce. Le KOH réagit avec les acides gras libérés pour former un savon, l'excès est ensuite dosé par une solution d'acide chlorhydrique (HCl).

$$I_S = \frac{(V_T - V_E) \times C_{HCl} \times M_{KOH}}{m}$$

$I_S$  : indice de saponification

$V_T$  : volume de solution d'acide chlorhydrique utilisé pour le témoin en mL.

$V_E$  : volume de solution d'acide chlorhydrique utilisé la solution d'échantillon.

$C_{HCl}$  : concentration d'acide chlorhydrique donnée.

$M_{KOH}$  : masse molaire du KOH en g/mol.

$m$  : masse d'huile exactement pesée en mg.

## VIII. SPECTROMÉTRIE INFRAROUGE A TRANSFORME DE FOURRIER

---

La spectrométrie infrarouge est très utilisée dans l'identification des groupements fonctionnels de métabolismes secondaires des plantes. La méthode consiste à exciter les molécules par des radiations infrarouges. L'absorption de ces rayonnements modifie les mouvements de vibration et de rotation des liaisons de molécules.

La spectrométrie IR est basée sur l'absorption ou la réflexion par l'échantillon des radiations électromagnétiques.<sup>48</sup>

La technique a été utilisée sur trois différents échantillons (la poudre de graines de nigelle, l'huile fixe et l'extrait brut). L'acide gallique, quercétine et l'acide ascorbique servent comme des témoins pour l'interprétation de nos spectres.



Figure 2 : Appareil infrarouge à transformé de Fourier.

## IX. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

La chromatographie sur couche mince est un outil précieux pour l'analyse en phytochimie.

Une plaque CCM est constituée d'un support d'aluminium sur lequel est fixé une fine couche de silice. La phase mobile peut contenir un ou plusieurs solvants.

L'échantillon étudié est déposé par une micropipette, le comportement de chaque molécule sur la plaque dépend des interactions existantes entre solutés, la phase mobile et la phase stationnaire.<sup>49</sup>

L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes :

- Directement si les substances sont colorées.
- A l'aide d'un révélateur si elles sont incolores.

Nos analyses sur couche mince ont été réalisées sur des plaques de silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck).

Avec deux systèmes de solvant :

- 1<sup>er</sup> système : acétate d'éthyle/ acide formique/ eau distillée (65/15/20)
- 2<sup>ème</sup> système : acétate d'éthyle/ n-hexane (70/30)

La plaque est séchée à température ambiante puis examinée à l'aide d'une lampe UV à des longueurs d'ondes de 254 nm et 365 nm.

CHAPITRE IV  
RESULTATS & DISCUSSION

## Introduction

Ce travail comporte l'étude de l'extraction d'extrait brut, huile fixe et huile essentielle de la graine *Nigella Sativa* en utilisant un extracteur pilote solide-liquide. Les résultats ainsi que les discussions seront menés au cours de ce chapitre.

### I. RENDEMENT DES EXTRAITS

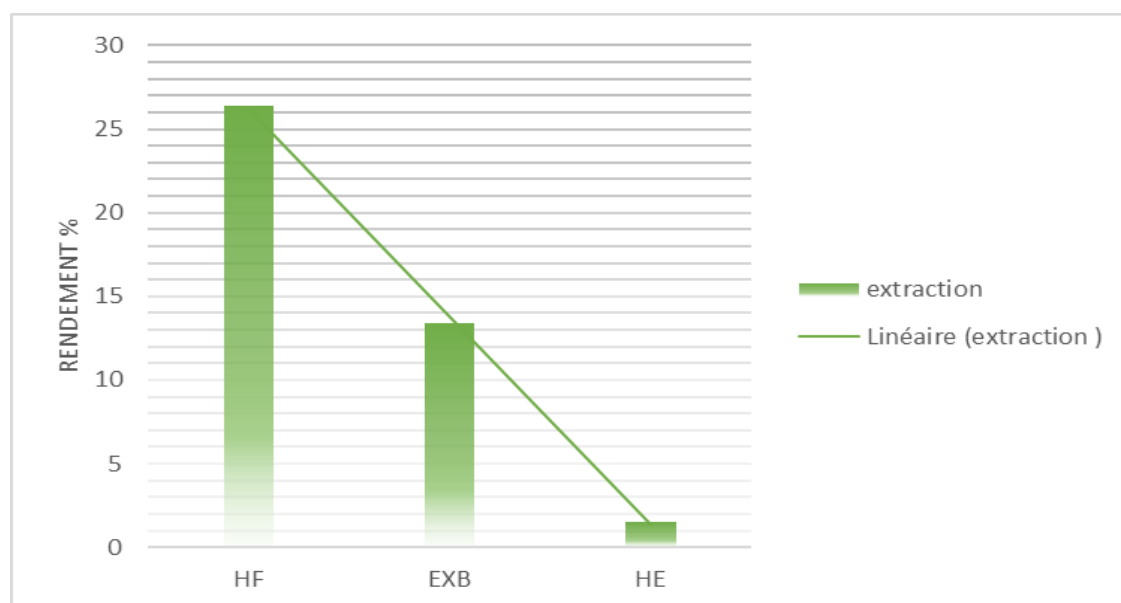


Figure 1 : Rendement en extrait.

Les trois extraits récupérés après extraction ont été filtrés et conservés pour la détermination de poids sec. Le rendement est calculé par rapport à 100 g de graines broyées et séchées. Le résultat est présenté en pourcentage sur la figure 1.

Selon le diagramme, l'extraction par les deux solvants a donné de bons rendements (supérieurs à 10 %) vis-à-vis l'hydrodistillation qui présente un rendement nettement faible (1,545 %).

L'extraction par le solvant apolaire (n-Hexane) représentée par l'huile fixe dans le diagramme, donne le meilleur rendement (26,43%), cela est dû à la quantité des composés apolaire contenus dans les graines tels que les lipides et les protéines majoritairement.



De même, l'extrait brut issu de l'extraction par solvant polaire (eau- éthanol) a donné un rendement de 13,38%, représenté par les composés secondaires tels que les polyphénols et les alcaloïdes.

Les composés volatiles (thymoquinone et thymohydroquinone) présentent en faible quantité dans la graine justifie le faible rendement.

Ces résultats ainsi obtenus par le pilote MP 1035 restent plus importants quant aux travaux réalisés sur les montages de Soxhlet traditionnels, et ceci montre l'efficacité de l'extraction sur pilote.

## II. DOSAGE DES POLYPHÉNOLS TOTAUX

---

Les polyphénols prennent de plus en plus de l'importance grâce à leurs bienfaits sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite l'intérêt pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies, également très utilisés comme additifs dans divers domaines.

La méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu a été utilisée pour le dosage des polyphénols totaux.

La teneur en polyphénols a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de contrôle positif effectuée (acide gallique) ; elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g E).

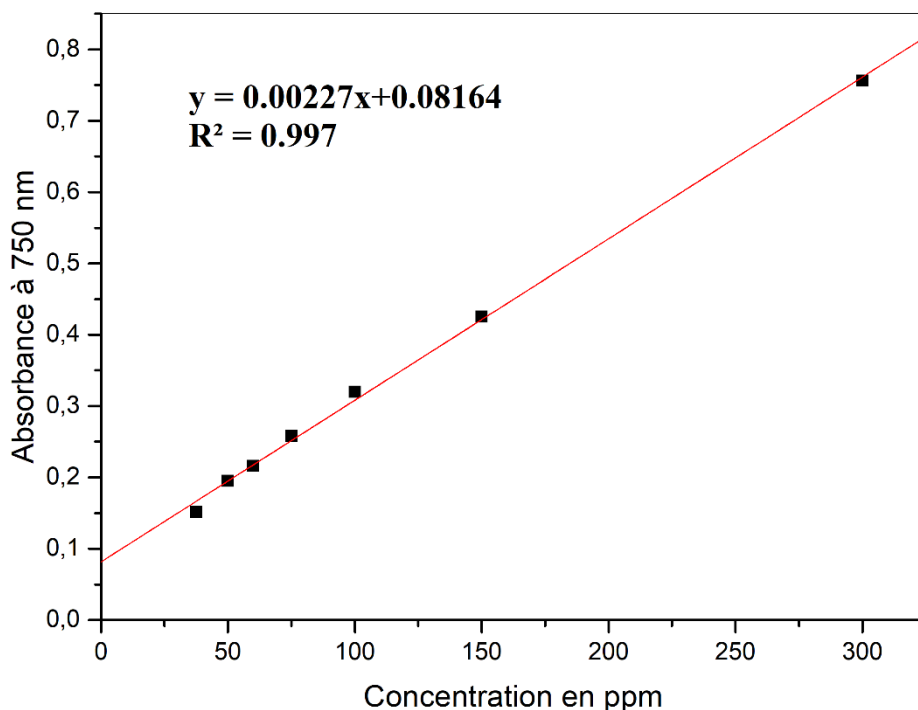


Figure 2 : Courbe d'étalonnage en acide gallique.

Les résultats obtenus sont représentés dans l'histogramme ci-dessous.

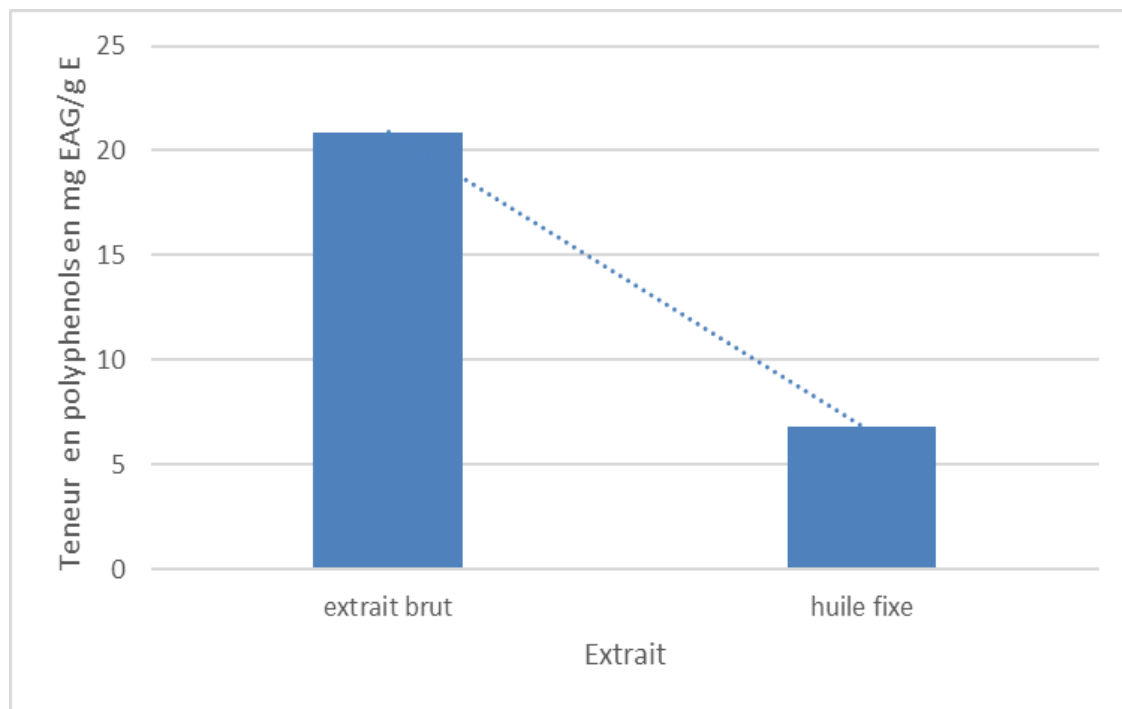


Figure 3 : Teneur en polyphénols des extraits.

L'extrait brut des graines de Nigelle a montré un taux élevé en polyphénols (20,89 mg EAG/g E), alors que l'huile fixe présente une valeur remarquablement faible (6,81mg EAG/g E).

### III. DOSAGE DES FLAVONOÏDES TOTAUX

Présents dans de nombreux aliments, les flavonoïdes sont des antioxydants de la famille des polyphénols ; ils sont responsables de la coloration des fleurs et des fruits.

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode de trichlorure d'Aluminium.

La teneur en flavonoïdes dans nos extraits a été exprimée en mg équivalent de quercétine par g de l'extrait (mg EQ/g E) à partir de la courbe d'étalonnage effectuée.

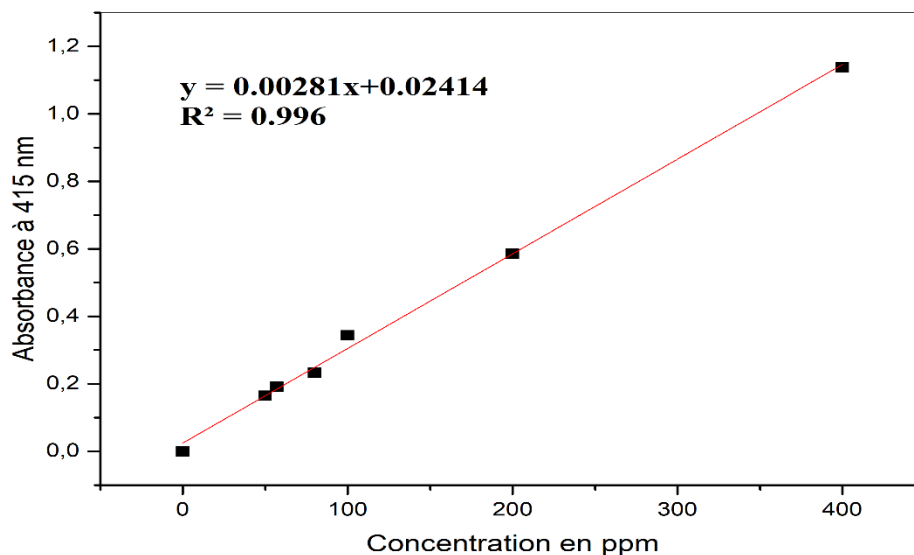


Figure 4 : Courbe d'étalonnage en quercétine.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 5.

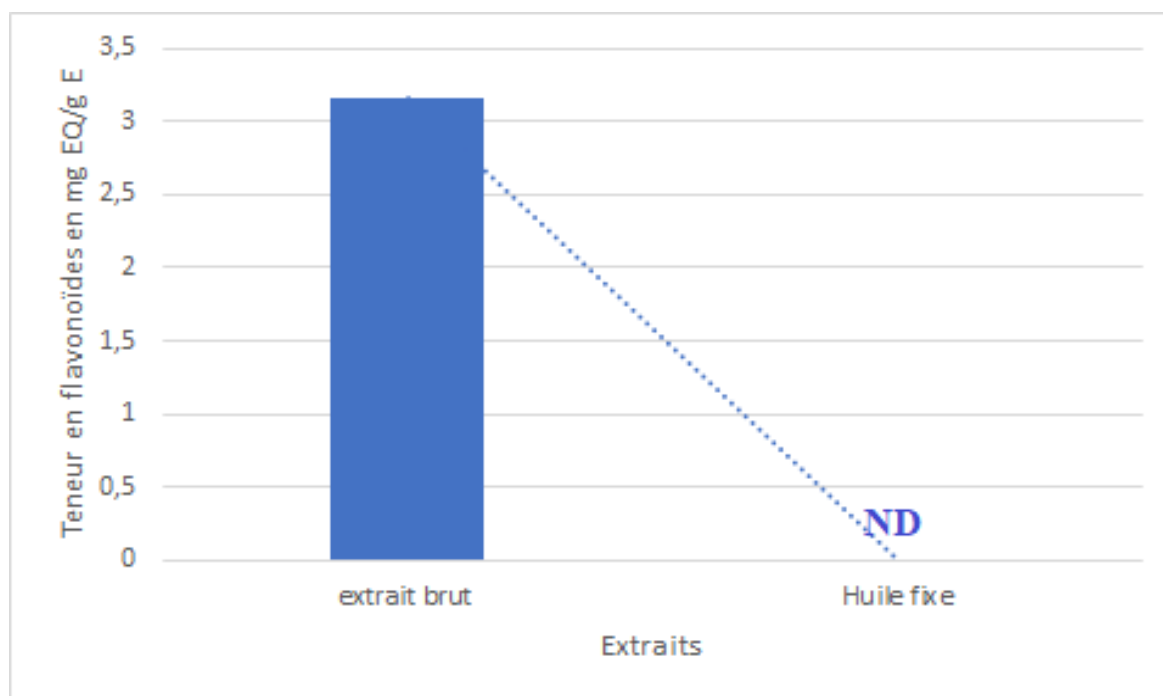


Figure 5 : Teneur en flavonoïdes des extraits.

L'extrait brut des graines de *Nigella Sativa* a présenté une teneur en flavonoïdes de 3,16 mg EQ/g E, contrairement à l'huile fixe qui a une valeur indéfinie pour une contrainte de solubilisation dans les solvants décrits dans le protocole.

#### IV. ETUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant ; pour cela deux méthodes ont été choisies pour l'évaluation de cette dernière.

##### IV.1 PIÉGEAGE DU RADICAL DPPH

Le composé chimique du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé dans l'étude de l'activité antioxydante des composés phénoliques présents dans les extraits.<sup>50</sup>

La réduction du radical DPPH par l'antioxydant présent dans les extraits testés est exprimée par la diminution de l'absorbance de ce radical suivie sur un spectrophotomètre UV-VISIBLE.

Les courbes tracées sur les figures 6 et 7 représentent le pourcentage d'inhibition des extraits en fonction de la concentration, la courbe standard (en acide ascorbique) est présentée sur la figure 8.

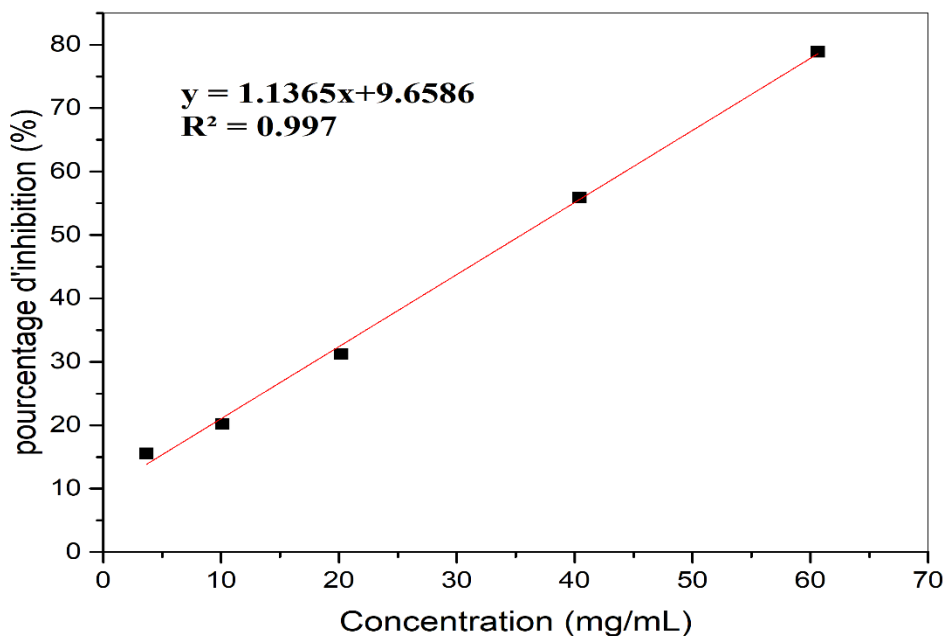


Figure 6 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut.

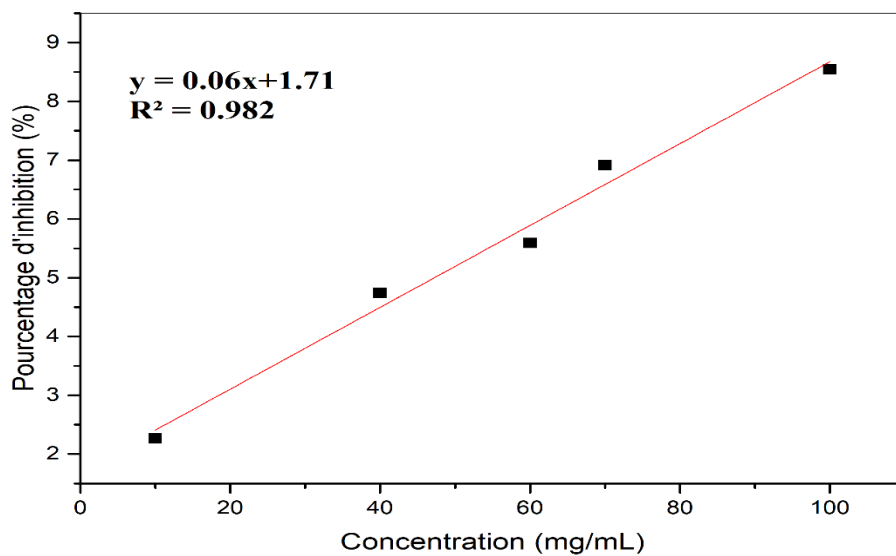


Figure 7 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'huile fixe.

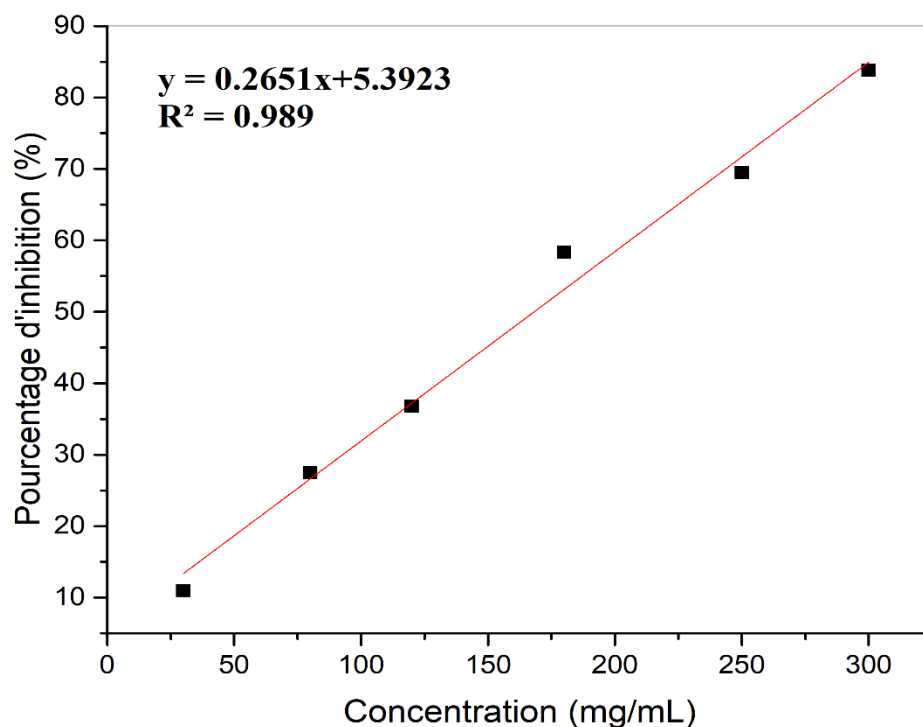


Figure 8 : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations en acide ascorbique.

L'activité antioxydante des différents extraits est mesurée par l'IC50, le paramètre qui correspond à la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical DDPH ; une faible valeur d'IC50 implique une activité antioxydante plus élevée.

Les histogrammes ci-dessous représentent une comparaison entre les IC50 de nos extraits à celui de l'acide ascorbique.

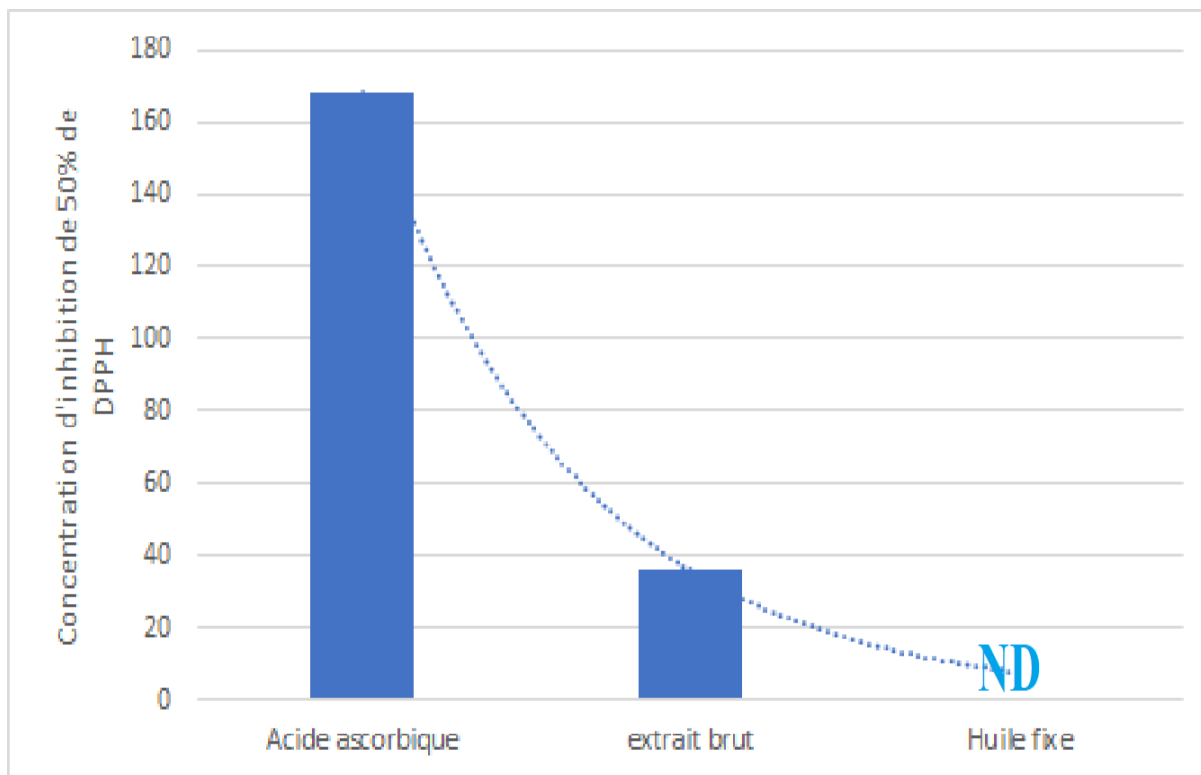


Figure 9 : Les IC50 des différents extraits et l'acide ascorbique.

Les résultats présentés (figure 9) montrent une différence appréciable entre l'effet antioxydant du standard et de l'extrait brut des graines de Nigelle.

L'IC50 de l'huile fixe de *Nigella sativa* reste indéterminable à cause de la non disponibilité d'un solvant approprié pour solubiliser l'huile.

D'après la figure 9, l'extrait brut a présenté une activité remarquablement importante par rapport à l'acide ascorbique (l'antioxydant standard).

## IV.2 TEST DE RÉDUCTION DE FRAP

La méthode FRAP est un essai rapide, simple et universel pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits.

L'électron libéré par les antioxydants présents dans nos extraits provoque la réduction du fer ferrique  $Fe^{3+}$  de couleur jaune à la forme fer ferreux  $Fe^{2+}$  de couleur bleu vert.

La réduction peut être suivie par la mesure de l'absorbance à 700 nm.

La figure 10 représente les histogrammes de l'absorbance en fonction de 3 concentrations différentes de l'extrait brut et l'acide ascorbique ; l'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur.

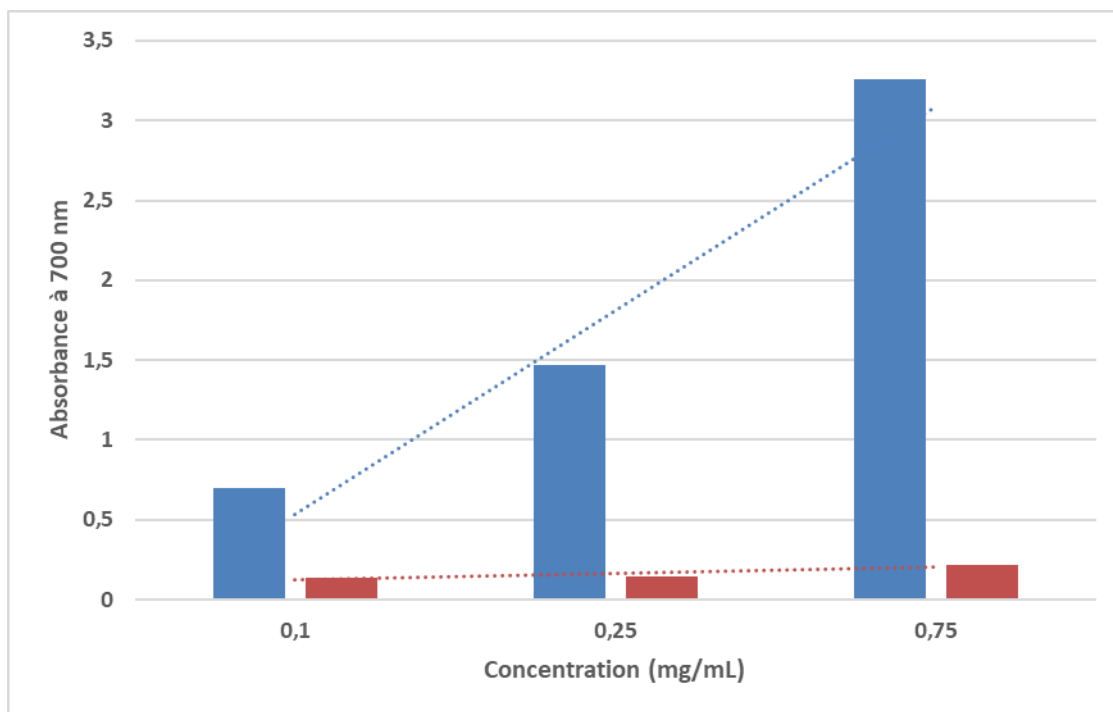


Figure 10 : Pouvoir réducteur de l'extrait brut (marron) et l'acide ascorbique (bleu).

D'après nos résultats, l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées.

De vue, on observe que la pente de la courbe de tendance de l'acide ascorbique est plus importante à celle de l'extrait brut qui présente une légère augmentation dans le pouvoir réducteur des trois solutions testées.

Le pouvoir réducteur de nos extraits dû à la richesse de ces extraits en substances polyphénoliques ont la tendance de libérer leur électron, ou proton du groupement hydroxyde.<sup>51</sup>



## V. ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

### V.1 ACTIVITÉ ANTIADHÉSIVE

Une fois que l'évaluation par la méthode de TCP est terminée, notre choix a été basé sur la souche la plus formatrice du biofilm.

Après avoir incubé les morceaux de sondes avec la suspension bactérienne et diverses concentrations de l'HF pendant 24h à 37°C, une série de dilution a été effectuée à chaque concentration (10%, 20%, 30% et 50%).

D'après les résultats obtenus à partir du dénombrement des boîtesensemencées sur gélose cétrimide, l'huile fixe de nigelle a empêché l'installation du biofilm sur les morceaux de sonde dans les diverses concentrations (voir figure 11).

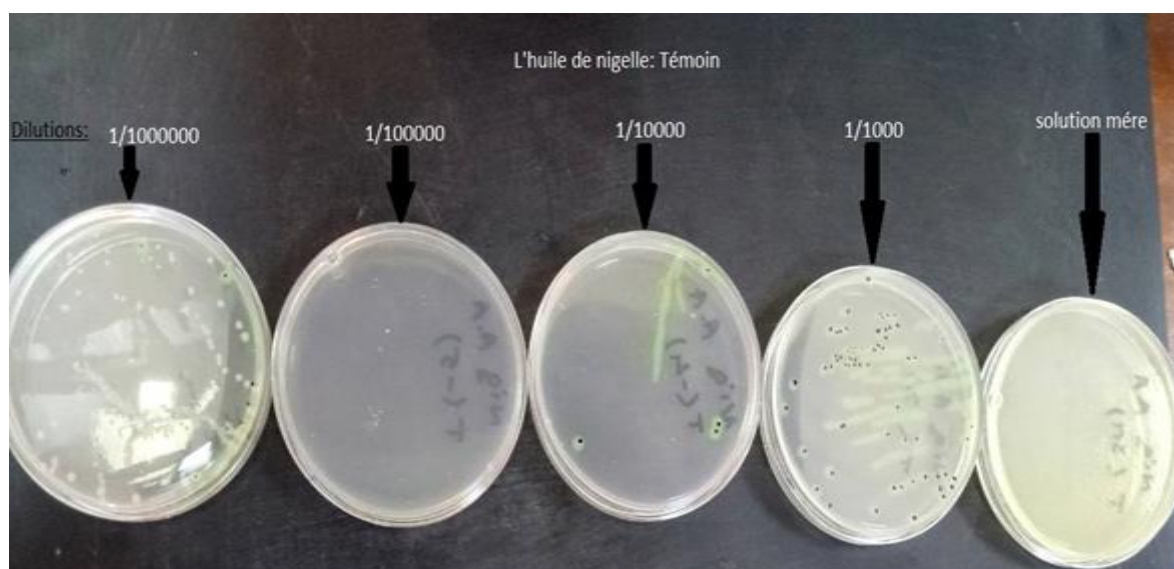


Figure 11 : Dénombrement de témoin de *Nigella sativa*.

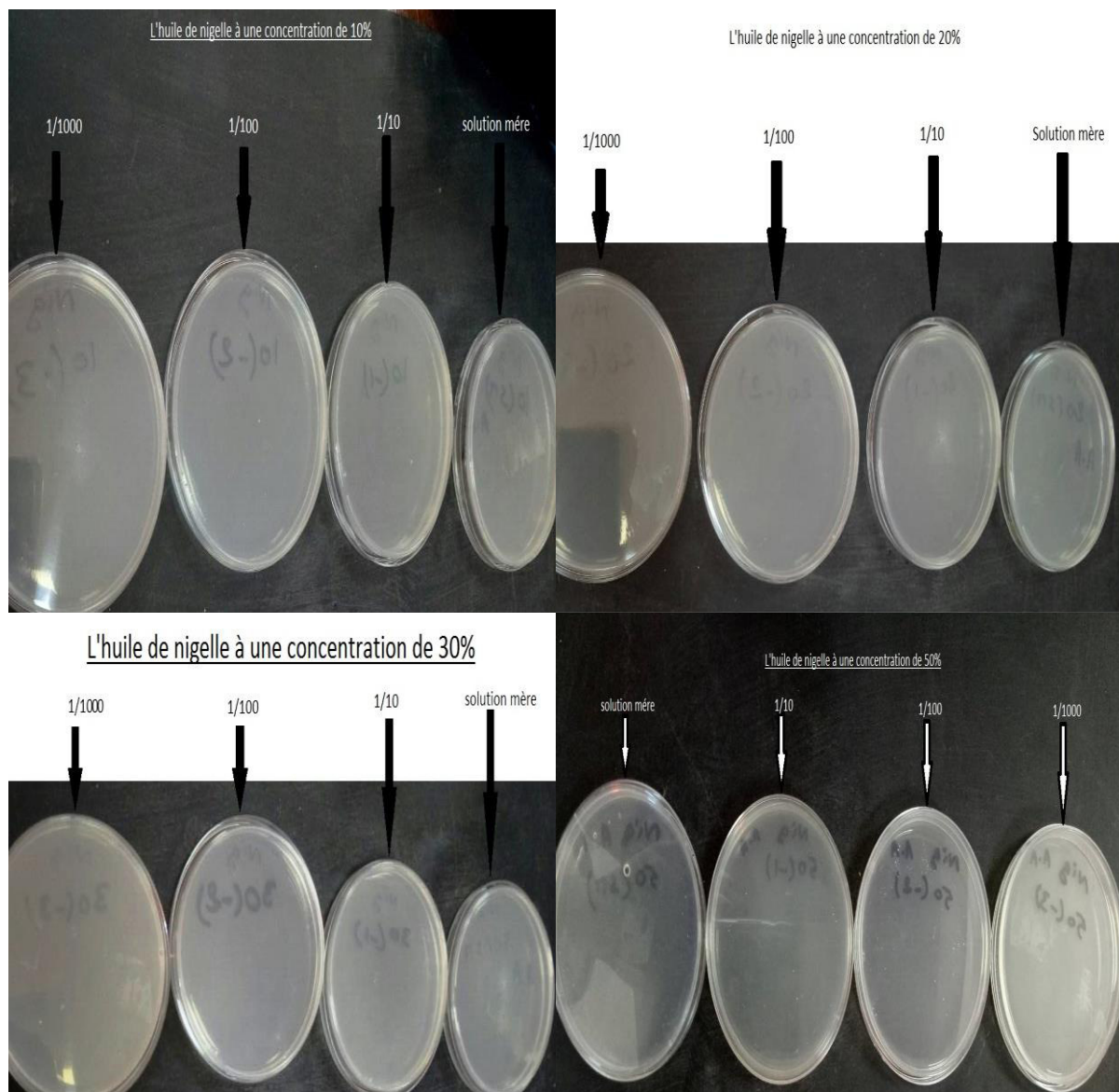


Figure 12 : Activité anti-adhésive du *N.sativa* sur *P. aeruginosa* à 10%, 20%, 30% et 50% respectivement.

## V.2 ACTIVITÉ ANTI-BIOFILM

Après l'incubation avec la suspension bactérienne de *P. aeruginosa*, 24h à 37°C, les morceaux de sondes sont rincés avec l'eau distillée puis mis dans des tubes contenant diverse concentrations d'HF (10%, 20%, 30% et 50%). Une série de dilutions est effectuée pour chaque échantillon.

Les résultats obtenus après dénombrement sur la gélose cétrimide, ont montré l'élimination du biofilm formé par l'huile, à une concentration de 10%, 20%, 30% et 50%

(figure 13), ce qui montre la forte activité bactérienne du *Nigella sativa* vis-à-vis de *P. aeruginosa*.

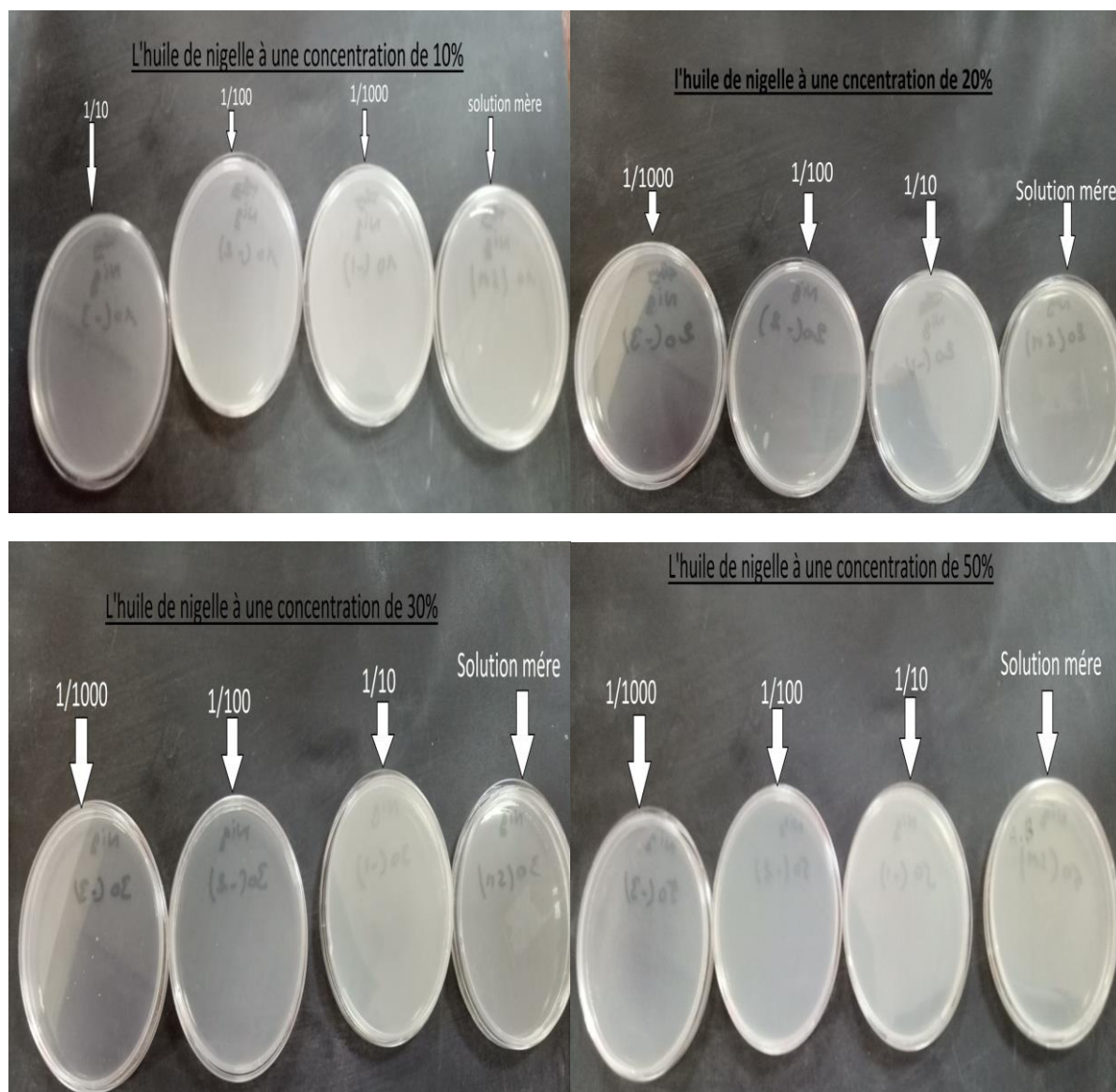


Figure 13 : Activité anti-biofilm de *N.sativa* sur *P. aeruginosa* à 10%, 20%, 30% et 50% respectivement.

## VI. PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES

- L'indice de densité est considéré comme un critère physique qui correspond à un ratio de densité d'une substance rapportée à la densité de l'eau. La densité de l'huile de Nigelle étudiée dans ce travail révèle une valeur de 0,9584, cette valeur est supérieure à celle trouvée dans des travaux antérieurs.<sup>52</sup>

- L'indice de réfraction est un paramètre important pour vérifier la pureté de l'huile, la lecture (1,4725) est similaire aux données rapportées.
- Le degré d'altération d'une huile est déterminé à travers son indice d'acide ; il s'agit d'un paramètre chimique de fraîcheur et de pureté d'une huile. Le résultat donné par notre huile (7 mg KOH/g) rentre dans l'intervalle caractérisant une bonne huile, inférieur à 10 mg KOH/g selon la compagnie du sens (Expert en huile).<sup>53</sup>
- L'indice de saponification correspond à la quantité en mg de KOH nécessaire pour saponifier 1g de graisse. 187,11 mg KOH/g est la valeur donnée par l'huile de Nigelle analysée, cette dernière est inférieure à celle trouvée dans la littérature.<sup>52</sup> L'indice de saponification renseigne sur la longueur de la chaîne carbonée des acides gras qui constituent les triglycérides (fraction majoritaire d'un corps gras).

La détermination de l'indice de saponification de l'huile de Nigelle a donné une valeur égale à 187,11 mg KOH/g pour *N. Sativa* et 175,88 mg KOH/g pour l'huile d'olive.

On remarque que la valeur de l'indice de saponification de *N. sativa* est plus grande que l'huile d'olive, ce qui montre que *N. sativa* contient plus d'acides gras à longues chaînes.

- On peut déduire que l'huile de *N. sativa* est une huile pure riche en acides gras à longues chaînes et insaturées.

Ces indices sont regroupés dans le tableau ci-dessous rapportant une comparaison entre les valeurs trouvées dans notre étude, dans la littérature et une huile commerciale.

Tableau 1 : Paramètres physicochimiques des huiles fixes.

Indices physico-chimiques	Huile de nigelle (étudiée)	Huile de nigelle (littérature) <sup>52</sup>	Huile de nigelle (commerciale) <sup>53</sup>
Densité à 20°C	0,9584	0,913	0,900 à 0,925
Indice de réfraction à 20°C	1,4725	1,684	1,470 à 1,476
Indice d'acide (mg KOH/g)	7	2,11	< 10
Indice de saponification (mg KOH/g)	187,11	223,57	185205

## VII. SPECTROSCOPIE IRTF

Les spectres infrarouges des échantillons testés et les standards ont été établis via un appareil IRTF, l'intervalle est situé entre (400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

Les spectres obtenus sont présentés respectivement dans les figures 14 et 15.

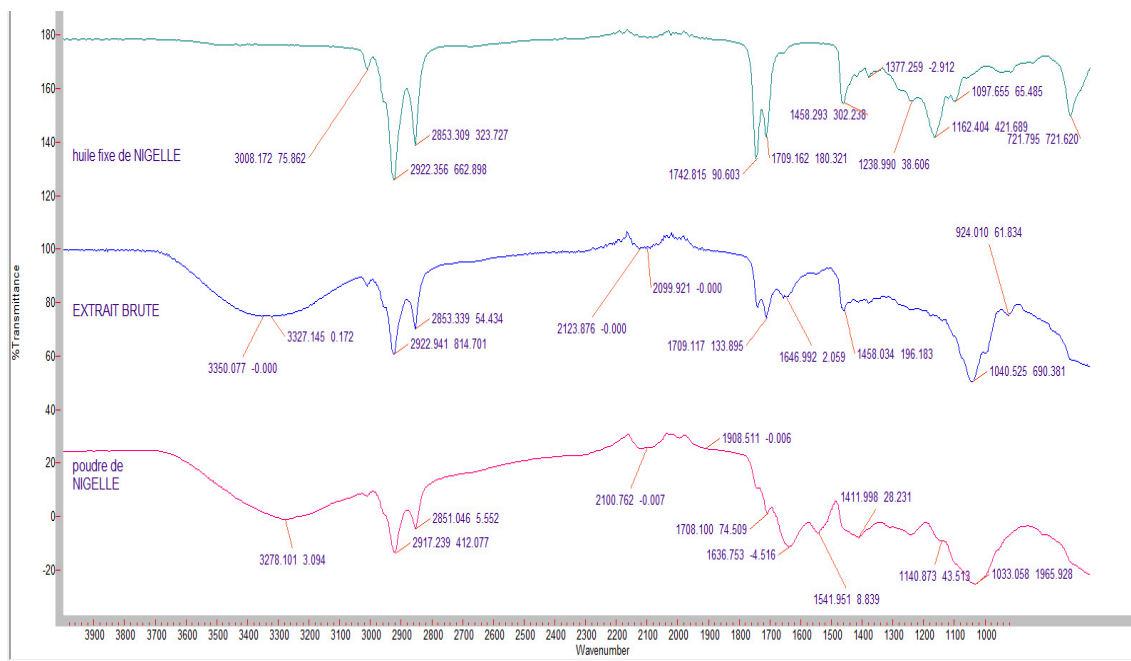


Figure 14 : Superposition des 3 spectres des échantillons testés.

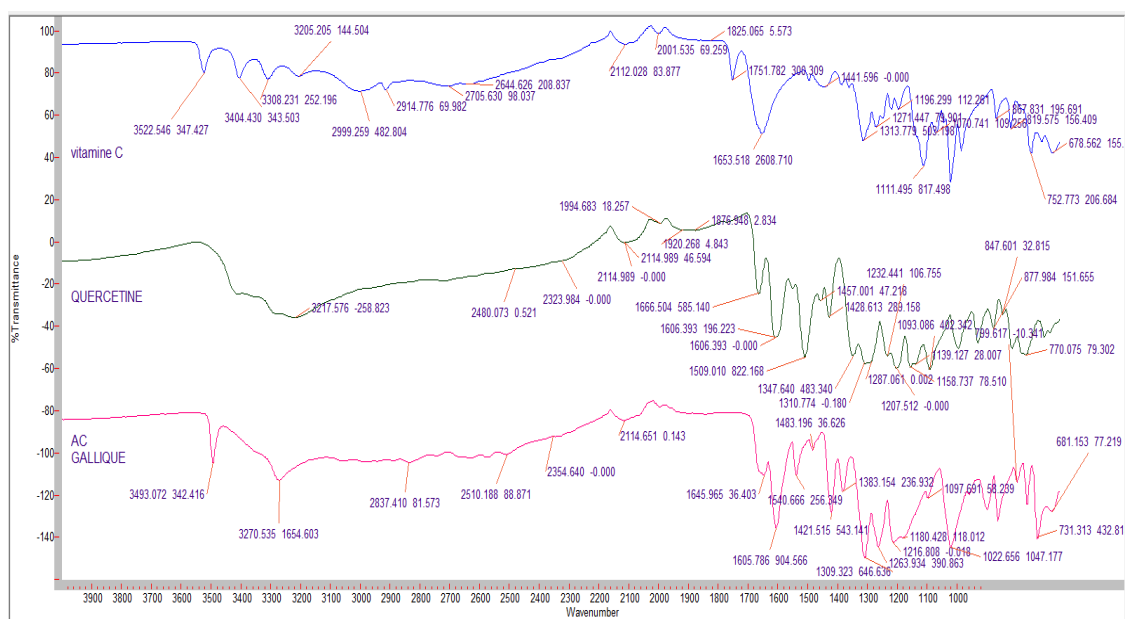


Figure 15 : Superposition des 3 spectres des standards utilisés.



Après l'interprétation des spectres, les bandes caractéristiques sont regroupées dans les tableaux 2 & 3.

Tableau 2 : Bandes caractéristiques des échantillons.

Groupement fonctionnel	Huile fixe	Extrait brut	Poudre de nigelle
<b>C=O</b>	1709	1646	1636
<b>C-H</b>	2853-2922	2853-2922	2851-2917
<b>O-H</b>	-	3350	3278

- L'unité de la fréquence est en  $\text{cm}^{-1}$

Tableau 3 : Bandes caractéristiques des standards.

Groupement fonctionnel	Quercétine	Acide gallique	Acide ascorbique
<b>C-H</b>	770	731	754
<b>C=C</b>	1606	1605	1455
<b>C=O</b>	1666	1645	1656
<b>O-H</b>	3217	3270	3311

- Les effets inductifs et mésomères peuvent provoquer des déplacements de fréquences des bandes d'absorption.

Les deux tableaux nous indiquent les bandes caractéristiques des principaux groupements fonctionnels.

Les mêmes groupements caractérisant les standards ont été observés dans les échantillons testés, l'intérêt de la technique infrarouge se réduit pour ainsi dire à une utilisation analytique dans l'identification de nos échantillons par comparaison avec des produits de référence.

D'après les ouvrages d'analyse systématique sur des séries de composés flavoniques, il s'avère quasi impossible de déterminer les structures à partir des données infrarouges.

## VIII. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Pour l'analyse qualitative du contenu phénolique de nos extraits on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince.

Les images des plaques CCM des deux systèmes sont représentées sur les figures 16 et 17.

Figure 16 : 1<sup>er</sup> systèmeFigure 17 : 2<sup>ème</sup> système.

Les spots 1, 2 et 3 représentent respectivement l'huile fixe, l'huile essentielle et l'extrait brut.

De nos résultats illustrés sur les figures 16 & 17, on voit des traînées de migration des spots dus à la fonction amine dans les composés majoritaires, on observe à la tête de la plaque que les trois spots se regroupent sur un seul point, on dit que les structures des trois composés majoritaires dans les trois échantillons sont similaires, ce qui rend quasi impossible la séparation.

Pour se débarrasser de traînées nous avons ajouté quelques gouttes d'ammoniac, mais toujours pas de séparation à la fin du développement des spots ; la séparation doit d'abord être faite sur une colonne avec le gel de silice avant application sur CCM pour identifier les sous classes de la famille des flavonoïdes contenus dans chaque échantillon.

Dans le premier système des taches apparues en haut de la plaque cela est dû à l'ajout de l'eau distillée dans la phase mobile.

Dans le deuxième système nous avons changé la polarité de l'éluant, on observe que les taches ont disparu.

On conclue que la CCM doit être jumelée à la chromatographie sur colonne pour la séparation et l'identification dans l'analyse des composantes principales d'un échantillon.



# CONCLUSION GENERALE

L'importance des flavonoïdes dans la chaîne alimentaire est d'une importance vitale pour l'organisme humain. Au terme de cette étude expérimentale, nous avons obtenu des résultats très probants et encourageants. En effet, les résultats de cette étude ont démontré que les extraits des graines de *Nigella sativa* sont très riches en acides gras et les polyphénols en plus de la présence d'autres nutriments tels que les vitamines, acides aminés et des quinones libres qui ont montré des potentialités en phytothérapie.

D'autre part, une supplémentation en huile fixe de *Nigella Sativa* a montré un effet bénéfique contre la reproduction d'une souche bactérienne de gram négatif type *Pseudomonas aeruginosa*, l'huile de nigelle empêche la formation des biofilms sur des sondes hospitalière, ainsi que l'élimination du biofilm sur des sondes infectées.

Par ailleurs, nous avons constaté que l'extraction solide-liquide sur le pilote MP1035 donne un rendement nettement meilleur que les autres techniques classiques utilisés.

MP1035 pilote dispose de deux techniques (extraction et distillation), permet la récupération des solvants utilisés à la fin de procédé ; ce qui est bénéfique sur les facteurs (temps, coût).

# REFERENCES

1. Ghedira, K. and R. Le Jeune, *Huile de nigelle cultivée, Nigella sativa L.(Ranunculaceae)*. Phytothérapie, 2010. 8(2): p. 124-128.
2. De Lanessan, J.L., *Manuel d'histoire naturelle médicale: Etude des plantes phanérogames et cryptogames. Part 2*. 1880: Octave Doin.
3. TOPARSLAN, C., *À propos de Nigella sativa L.* 2012, Thèse de Pharmacie. Université de Nancy.
4. Ozenda, P., *Les végétaux, organisation et diversité biologique 2eme Edition*. 2000, Masson: pp.
5. Spichiger, R.-E., et al., *Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales*. 2002: PPUR presses polytechniques.
6. Carole Minker, C.D., *200 plantes qui vous veulent du bien*. 2013. 448.
7. Collectif, *Larousse Des Plantes Medicinales*. 2011.
8. Heiss, A.G., et al., *Seed morphology of Nigella sl (Ranunculaceae): Identification, diagnostic traits, and their potential phylogenetic relevance*. International Journal of Plant Sciences, 2011. 172(2): p. 267-284.
9. Abdelkader, A., *Étude de la diversité biologique des plantes cultivées des palmeraies de la région du Haut Oued Righ*. 2015, université Kasdi Merbah Ourgla
10. Özel, A., et al., *Farklı Sıra Aralığı ve Tohumluk Miktarlarının Çörek Otunda (Nigella sativa L.) Verim ve Bazı Tarımsal Karakterlere Etkisi*. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2009. 13(1): p. 17-25.
11. Kökdil, G. and H. Yılmaz, *Analysis of the fixed oils of the genus Nigella L.(Ranunculaceae) in Turkey*. Biochemical systematics and ecology, 2005. 33(12): p. 1203-1209.
12. [http://www.ipni.org/ipni/advPlantNameSearch.do?find\\_genus=nigella](http://www.ipni.org/ipni/advPlantNameSearch.do?find_genus=nigella).
13. <https://plants.jstor.org/search?plantName=nigella>.
14. <http://apps.kew.org/herbcat/getHomePageResults.do?homePageSearchText=nigella>.
15. Ferrufino-Acosta, L., *Taxonomic revision of the genus Smilax (Smilacaceae) in Central America and the Caribbean Islands*. Willdenowia, 2014. 40(2): p. 227-280.
16. Heiss, A.G. and K. Oeggl, *The oldest evidence of Nigella damascena L.(Ranunculaceae) and its possible introduction to central Europe*. Vegetation history and archaeobotany, 2005. 14(4): p. 562-570.
17. KÖKDİL, G., et al., *MORPHOLOGY AND STEM ANATOMY OF SOME SPECIES OF GENUS NIGELLA L. IN TURKEY TÜRKİYE'DEKİ BAZI NİGELLA TÜRLERİNİN MORFOLOJİ VE GÖVDE ANATOMİLERİ*. 2006. 1: p. 41.
18. Bayramoğlu, M.M., D. Toksoy, and G. Şen, *Türkiye'de tıbbi bitki ticareti. II*. Ormancılıkta Sosyo-Ekonomik Sorunlar Kongresi, 2009: p. 19-21.
19. Bureau, L., *L'arrêté «Plantes et compléments alimentaires»: la phytothérapie remise en question*. Phytothérapie, 2014. 12(5): p. 265-283.
20. Ahmad, A., et al., *A review on therapeutic potential of Nigella sativa: A miracle herb*. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 2013. 3(5): p. 337-352.
21. Mathur, M.L., et al., *Antidiabetic properties of a spice plant Nigella sativa*. Journal of Endocrinology and Metabolism, 2011. 1(1): p. 1-8.
22. Swamy, S. and B. Tan, *Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of Nigella sativa L. seeds*. Journal of ethnopharmacology, 2000. 70(1): p. 1-7.
23. Ivankovic, S., et al., *The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo*. Exp Oncol, 2006. 28(3): p. 220-224.

24. Nergiz, C. and S. Ötles, *Chemical composition of Nigella sativa L. seeds*. Food chemistry, 1993. 48(3): p. 259-261.
25. Greenish, H., *Contribution to the Chemistry of Nigella sativa*. Pharmac J Trans 1880, 1880. 10: p. 909-911.
26. Sultan, M.T., et al., *Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil*. Pak J Bot, 2009. 41(3): p. 1321-1330.
27. Aboutabl, E., A. El-Azzouny, and F. Hammerschmidt. *Aroma volatiles of Nigella sativa L. seeds*. in *Prog Essent Oil Res., Proceeding International Symposium Essential Oils*. DeGruyer, Berlin. 1986.
28. Canonica, L., et al., *The pharmacologically active principle in Nigella sativa*. Gazz Chim Ital, 1963. 93(1): p. 404-407.
29. Burits, M. and F. Bucar, *Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil*. Phytotherapy research, 2000. 14(5): p. 323-328.
30. Merfort, I., et al., *Flavonol triglycosides from seeds of Nigella sativa*. Phytochemistry, 1997. 46(2): p. 359-363.
31. Bourgou, S., et al., *Phenolic composition and biological activities of Tunisian Nigella sativa L. shoots and roots*. Comptes Rendus Biologies, 2008. 331(1): p. 48-55.
32. [http://www.orient-bien-etre.com/cgibin/prog/pform.cgi?langue=fr&TypeListe=showdoc&Mcenter=galeriephoto&mot\\_cle\\_show=&ID\\_document=31](http://www.orient-bien-etre.com/cgibin/prog/pform.cgi?langue=fr&TypeListe=showdoc&Mcenter=galeriephoto&mot_cle_show=&ID_document=31).
33. Houghton, P.J., et al., *Fixed oil of Nigella sativa and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation*. Planta medica, 1995. 61(01): p. 33-36.
34. Ghedira, K., *La nigelle cultiv'ée: Nigella sativa L. (Ranunculaceae)*. Phytothérapie, 2006. 4(5): p. 220.
35. Deltalab, [https://www.deltalab-smt.com/fr/genie-des-procedes/chimie/mp1035/extraction-solide-liquide-discontinue-soxhlet-et-distillation-discontinue\\_ca55.html](https://www.deltalab-smt.com/fr/genie-des-procedes/chimie/mp1035/extraction-solide-liquide-discontinue-soxhlet-et-distillation-discontinue_ca55.html).
36. deltalab, *Buletin technique extraction solide-liquide discontinue Distillation discontinue MP1035/N°14*. 2015. 74.
37. El-Haci, I., et al., *Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien*. Phytothérapie, 2012. 10(5): p. 280-285.
38. Singleton, V.L. and J.A. Rossi, *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American journal of Enology and Viticulture, 1965. 16(3): p. 144-158.
39. Kim, D.-O., et al., *Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. 51(22): p. 6509-6515.
40. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Analytical biochemistry, 1996. 239(1): p. 70-76.
41. Benzie, I.F. and M. Devaki, *The 5 ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non- enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications*. Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications, 2017: p. 77.
42. Pérez-Ramírez, I.F., et al., *Effect of stevia and citric acid on the stability of phenolic compounds and in vitro antioxidant and antidiabetic capacity of a roselle (Hibiscus sabdariffa L.) beverage*. Food chemistry, 2015. 172: p. 885-892.

43. Krimat, S., et al., *Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of hydromethanolic extract of Origanum glandulosum Desf.* Phytothérapie, 2017.
44. O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter, *Biofilm formation as microbial development.* Annual Reviews in Microbiology, 2000. 54(1): p. 49-79.
45. Manju, S., et al., *Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic effects of Nigella sativa essential oil coated gold nanoparticles.* Microbial pathogenesis, 2016. 91: p. 129-135.
46. Sahbaz, A., F. Ersan, and S. Aydin, *Effect of Nigella sativa oil on postoperative peritoneal adhesion formation.* Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2014. 40(2): p. 532-537.
47. Chaieb, K., et al., *Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of Nigella sativa and its potency to prevent bacterial biofilm formation.* BMC complementary and alternative medicine, 2011. 11(1): p. 29.
48. Hovaneissian, M., et al., *Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin.* Comptes Rendus Chimie, 2006. 9(9): p. 1192-1202.
49. Taouzinet, M. and H.E. Aoudia, *Extraction, dosage et fractionnement sur CCM des composés phénoliques des feuilles de Melia azedarach.* 2017, Université A. MIRA - Bejaia.
50. Blois, M.S., *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.* Nature, 1958. 181(4617): p. 1199.
51. Vermerris, W. and R. Nicholson, *Isolation and identification of phenolic compounds,* in *Phenolic compound biochemistry.* 2008, Springer. p. 151-196.
52. Didi, A., *Effet préventif, correctif et régulateur de certaines huiles végétales (nigelle-olive) sur la mise en place des maladies métaboliques.* 2015, Université Abou Bakr Belkaid. p. 183.
53. <https://www.compagnie-des-sens.fr/huile-vegetale-nigelle/>.