



Faculté des Sciences et Technologies

Département de Génie des Procédés

Laboratoire de Génie des Procédés et de Chimie des Solutions (LGPCS)

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Génie des Procédés et Environnement

Intitulée :

Optimisation et étude physicochimique et microbiologique d'un extrait d'une plante médicinale (*Nigella Sativa.L*) et son pouvoir antioxydant

Présentée par : Mr GUEFFAI ABDELKRIM

Le : 19 / 12 / 2023

Devant le jury :

Président	BOUCHEKARA Mohamed	Pr.	Université de Mascara
Examineur	BENREGUIEG Mokhtar	MCA.	Université de Saida
Examineur	BENMOHAMMED Abdelmadjid	MCA.	Université de Mascara
Encadreur	OULDMOUMNA Aoumria	MCA.	Université de Mascara
Co-encadreur	KIARI Fatima Zohra	MCB.	Université de Mascara

Année Universitaire : 2023-2024

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



DEDICACE

Je dédie ce travail :

A mes **chers parents**, qui m'ont tout donné sans rien en retour, Qui ont toujours cru en moi et qui ont mis à ma disposition tous les moyens requis pour mon éducation et mon instruction, pour leurs aides, leurs patiences et leurs soutiens inconditionnels. Sans vous, rien de tout cela ne serait possible.

A mon **frère** Ibrahim El Khalil

A ma **sœur** et ses enfants

Ritedj & Djaoued

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier **Dieu** le tout puissant et miséricordieux pour nous avoir donné la force et la patience d'accomplir ce travail de recherche. Louanges et remerciements à **ALLAH** qui nous a permis aujourd'hui de nous rassembler pour soutenir ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de recherche de bioconversion génie microbiologique et sécurité sanitaire LBGMS de l'université de Mascara Mustapha Stambouli, ainsi qu'au Laboratoire de chimie organique de l'université Castilla-la Mancha en Espagne UCLM.

Je tiens à exprimer mes plus chers et vifs remerciements à **Mme. Ouldmounna Aoumria**, mon directeur de thèse. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité, vos conseils et pour la confiance que vous m'aviez témoigné tout au long de cette étude. J'espère qu'à l'avenir nous serons amenés à échanger de nouveau sur des sujets passionnants.

J'exprime mes sincères remerciements à **M^{LLE}. Kiari Fatima Zohra**, co-directeur de cette thèse, pour m'avoir guidé pendant toutes ces années ainsi que pour sa gentillesse, sa disponibilité et la qualité de ses conseils. Merci d'être un excellent accompagnateur faisant preuve d'un dosage équilibré entre l'autonomie et la direction tout en m'initiant à la recherche scientifique avec exigence et générosité

J'exprime mes respectueux remerciements à **Mr. Bouchkara Mohamed**, professeur à l'université de Mascara, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider ce Jury.

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ces travaux de recherche.

Mes remerciements s'adressent à **Mr. Benreguieg Mokhtar** MCA à l'université de Saida et à **Mr. Benmohammed Abdelmadjid** MCA à l'université de Mascara, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et de l'intérêt qu'ils ont porté à ces travaux.

Un grand respectueux remerciement à **Mr. Bellil Ali**, professeur et directeur de laboratoire de génie des procédés et chimie des solutions (LGPCS) et à **Mr. Bellifa Abderrahim**, MCA et directeur de laboratoire des matériaux, applications et environnement (L.M.A.E) à l'université de Mascara Mustapha Stambouli.

Je voudrais exprimer ma sincère reconnaissance à **Mr. Debbat Mohamed**, docteur à l'université de Mascara pour son aide et ses conseils, ainsi je dois lui exprimer mon respect et mes respectueuses grâces.

J'exprime ma vive gratitude à **Mme. Atma Wafaa**, chef de département de génie des procédés de l'université de Mascara, pour son aide, sa disponibilité et ses conseils.

Mes remerciements vont également à **Mlle. Labri Khadîdja**, qui m'a beaucoup aidé en tant qu'encadrante en mastère et grâce à qui j'ai acquis une bonne formation.

J'adresse également mes remerciements à **Mme. Elhachemi Kenza**, docteur à l'université de Mascara pour son aide et ses conseils.

Mes profondes gratitude s'orientent vers **Mr. Bousedra.D & Mr. Hafid** ingénieurs de laboratoire pédagogique à l'Université de Mascara pour leurs aides et leurs générosités.

Je n'oublierai jamais à remercier chaleureusement **Mme.Yekhlef.M** et tous les administrateurs de département de génie des procédés

J'exprime toute ma gratitude au professeur **Andrés Moreno Moreno** de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche à UCLM et de m'avoir fait l'honneur de partager sa passion et son enthousiasme pour la recherche scientifique.

Mes remerciements vont également à mes amis qui m'ont aidé d'une manière directe ou indirecte

Je suis très reconnaissant envers toute personne, qui m'a aidé à réaliser ce travail.

ABSTRACT

RÉSUMÉ

ملخص

Abstract

This research work focuses on the extraction of polyphenols from black cumin seeds using the Ultrasonic Assisted Extraction method (UAE). This technique makes it possible to improve the extraction by damaging the membranes and/or cell walls. The effect of ultrasound on the extraction of polyphenols was highlighted through a quantitative and qualitative optimization study: monitoring of the yield of polyphenols, antioxidant and antibacterial activities, as well as a physicochemical characterization of the compounds extracts by applying the Response Surface Methodology (RSM) based on a Box–Behnken (BBD) design.

In order to increase the extraction efficiency of phenolic compounds from *Nigella Sativa*.L seeds, the optimal extraction conditions were determined as follows: ethanol concentration of 59.1%, extraction temperature of 44, 6 °C and extraction time of 32.5 min. Under these conditions, the total phenolic content and DPPH radical scavenging activity increased by about 35,6 (mg GAE/g) and 70,5 %, respectively, compared to the conventional extraction of about 20.9 (mg GAE/g) and 51.1%. Concerning the antimicrobial activity, the ethanolic extract of *Nigella Sativa* seeds shows a non-sensitive antimicrobial effect against the tested microbial strains. This extract displays bactericidal activity with a minimum bactericidal concentration (MBC) of (75 mg/ml) against *Escherichia coli*, while its impact is not distinctly observable against *Staphylococcus aureus*. In addition, a complementary quantitative analysis of the individual phenolic compounds was carried out by the HPLC-UV technique. The phenolic composition revealed high amounts of epicatechin (1.88–2.37 mg/g) and rutin (0.96–1.21 mg/g) in the black cumin seed extracts.

Ultrasound-assisted extraction may be a useful method for the recovery of polyphenols from defatted black cumin seeds.

Keywords: Phenolic compounds; Antioxidant; Optimization; Ultrasound assisted extraction; Black cumin; Response surface methodology

Résumé

Ce travail de recherche concerne l'extraction des polyphénols à partir des graines de *Nigella Sativa.L* par la méthode d'ultrasons (UAE). Cette technique permet d'améliorer l'extraction par endommagement des membranes et/ou parois cellulaires. L'effet d'ultrasons sur l'extraction des polyphénols a été mis en évidence à travers une étude d'optimisation quantitative et qualitative, suivi du rendement des polyphénols, de l'activité antimicrobienne et antioxydante, ainsi une caractérisation physicochimique des composés extraits, en appliquant la méthodologie de surface de réponse (RSM) basée sur un design Box–Behnken (BBD).

Afin d'augmenter l'efficacité d'extraction des composés phénoliques des graines de *Nigella Sativa.L*, les conditions d'extraction optimales ont été déterminées comme suit : concentration d'éthanol de 59,1 %, température d'extraction de 44,6 °C et durée d'extraction de 32,5 min. Dans ces conditions, la teneur phénolique totale et l'activité de piégeage des radicaux DPPH ont augmenté d'environ 35,6 (mg EAG/g) et 70,5 %, respectivement, par rapport à l'extraction conventionnelle d'environ 20,9 (mg EAG/g) et 51,1 %. En ce qui concerne l'activité antimicrobienne, l'extrait éthanolique des graines de *Nigella Sativa* n'a montré aucun effet antimicrobien contre les souches examinées. Cet extrait présente une action bactéricide avec une concentration minimale bactéricide (CMB) de (75 mg/ml) contre *Escherichia coli*, tandis que son effet n'est pas clairement discernable contre *S. aureus*. De plus, une analyse quantitative complémentaire des composés phénoliques individuels a été réalisée par la technique HPLC-UV. La composition phénolique a révélé de grandes quantités d'épicatéchine (1,88–2,37 mg/g) et de rutine (0,96–1,21 mg/g) dans les extraits de graines du cumin noir.

L'extraction assistée par ultrasons peut être une méthode d'extraction utile pour la récupération des polyphénols à partir des graines du cumin noir dégraissées.

Mots clés : Composés phénoliques ; Antioxydant ; Optimisation ; Extraction assistée par ultrasons ; Cumin noir ; Méthodologie de surface de réponse.

ملخص

يتعلق هذا العمل البحثي باستخلاص مادة البوليفينول من بذور حبة البركة *Nigella Sativa.L* بطريقة الموجات فوق الصوتية (UAE). تتيح هذه التقنية تحسين الاستخراج عن طريق إتلاف الأغشية و/أو جدران الخلايا. تم تسليط الضوء على تأثير الموجات فوق الصوتية على استخلاص البوليفينول من خلال دراسة تحسين كمية ونوعية، ومراقبة إنتاجية البوليفينول، والنشاط المضاد للميكروبات ومضادات الأكسدة، بالإضافة إلى التوصيف الفيزيائي والكيميائي للمركبات المستخرجة، من خلال تطبيق منهجية سطح الاستجابة (RSM) بناءً على تصميم Box- (Behnken) (BBD).

من أجل زيادة كفاءة استخلاص المركبات الفينولية من بذور حبة البركة، تم تحديد ظروف الاستخلاص المثلى على النحو التالي: تركيز الإيثانول 59.1٪، درجة حرارة الاستخلاص 44،6 درجة مئوية وزمن الاستخلاص 32.5 دقيقة. في ظل هذه الظروف، زاد إجمالي محتوى الفينول ونشاط الكسح الجذري DPPH بحوالي 35.6 (ملجم EAG/جم) و70.5٪، على التوالي، مقارنة بالاستخلاص التقليدي بحوالي 20.9 (ملجم EAG/جم) و51.1٪. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للميكروبات، لم يظهر المستخلص الإيثانولي لأغلفة حبة البركة أي آثار مضادة للميكروبات ضد السلالات التي تم فحصها. يُظهر هذا المستخلص تأثيرًا مبيدًا للجراثيم بتركيز لا يقل عن (75 ملغم/مل) ضد الإشريكية القولونية، في حين أن تأثيره لا يمكن تمييزه بوضوح ضد المكورات العنقودية الذهبية. بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء تحليل كمي تكميلي للمركبات الفينولية الفردية بواسطة تقنية HPLC-UV. كشف التركيب الفينولي عن وجود كميات عالية من الإبيكاتشين (1.88-2.37 ملغم/جم) والروتين (0.96-1.21 ملغم/جم) في مستخلصات بذور الكمون الأسود.

يمكن أن يكون الاستخلاص بمساعدة الموجات فوق الصوتية طريقة استخلاص مفيدة لاستعادة مادة البوليفينول من بذور الكمون الأسود منزوعة الدهن.

الكلمات المفتاحية: مركبات فينولية؛ مضادات الأكسدة. تحسين؛ الاستخراج بمساعدة الموجات فوق الصوتية؛ الكمون الأسود؛ منهجية استجابة السطح

Liste des figures

Partie I :

Figure I. 01 : Plantes médicinales « feuilles, graines, tiges ».....	07
Figure II. 01 : Les graines de <i>Nigella Sativa.L</i>	17
Figure II. 02 : La fleur et le fruit de <i>Nigella sativa. L</i>	19
Figure II. 03 : La plante entière de <i>Nigella Sativa.L</i>	20
Figure III. 01 : Structure chimique de différents composés phénoliques.....	39
Figure III. 02 : Structure chimique de l'ion phénoxyde.....	40
Figure III. 03 : Cycles de compression et de raréfaction induits par les ondes sonores.....	44
Figure III. 04 : Implosion d'une bulle de cavitation et formation de micro-jets à la surface du solide.....	45
Figure III. 05 : Bain à ultrasons (a) et sonde à ultrasons (b).....	47
Figure III. 06 : Réacteur pour extraction par ultrasons des tissus de plantes.....	48

Partie II :

Figure I. 01 : Carte géographique montrant la zone de collecte.....	58
Figure I. 02 : la forêt "Chouachi » et les graines de <i>Nigelle sativa</i>	59
Figure I. 03 : Les graines de <i>Nigella sativa</i> broyées par un broyeur Pulverisette 14 (FRITSCH, Idar-Oberstein, Allemagne)	59
Figure I. 04 : Diagramme général de la procédure expérimentale.....	60
Figure I. 05 : Image graphique du Design Box-Behnken.....	62
Figure I. 06 : Montage utilisé pour l'extraction des polyphénols par les ultrasons.....	65
Figure I. 07 : Schéma représentant les étapes de préparation des extraits de <i>N. sativa</i>	67
Figure I. 08 : Extraction conventionnelle par « décoction ».....	68
Figure I. 09 : Dosage des polyphénols totaux des graines de <i>N. sativa</i>	69
Figure I. 10 : Solution du standard d'acide gallique à différentes concentrations.....	70
Figure I. 11 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.....	70
Figure I. 12 : Mécanisme d'action du DPPH*.....	71
Figure I. 13 : Différentes concentrations d'extrait de <i>N. sativa</i> pour le test du DPPH*.....	72
Figure I. 14 : Préparation de l'inoculum bactérien pour l'aromatogramme	79

Figure I. 15 : Boîtes de pétrie ensemencées.....	80
Figure I. 16 : Principe de la méthode de diffusion par disque	81
Figure I. 17 : Différentes concentrations d'extrait éthanolique de <i>Nigella Sativa</i>	81
Figure I. 18 : Préparation de l'inoculum bactérien pour la CMI.....	83
Figure I. 19 : Extrait éthanolique de <i>Nigella Sativa</i>	84
Figure I. 20 : Evaluation du pouvoir antibactérien avec une microplaque à 96 puits.....	84
Figure II. 01 : Le rendement d'extraction des différents extraits de <i>Nigella sativa L.</i>	91
Figure II. 02 : Diagnostic des valeurs prédites et réelles pour le TPC.....	97
Figure II. 03 : Diagnostic des valeurs prédites et réelles pour le DPPH.....	98
Figure II. 04 : Résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits de <i>N. sativa</i>	99
Figure II. 05 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et de la concentration du solvant sur les polyphénols totaux.....	100
Figure II. 06 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet du temps d'extraction et de la concentration du solvant sur les polyphénols totaux.....	100
Figure II. 07 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet du temps d'extraction et de la température d'extraction sur les polyphénols totaux.....	101
Figure II. 08 : Effet des facteurs d'extraction (A : concentration d'éthanol ; B : température ; C : temps d'extraction) sur les polyphénols totaux.....	105
Figure II. 09 : Résultats de l'activité antioxydante des extraits de <i>N. sativa</i>	106
Figure II. 10 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et de la concentration du solvant sur le piégeage du radical DPPH.....	107
Figure II. 11 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet du temps d'extraction et de la concentration du solvant sur le piégeage du radical DPPH.....	107
Figure II. 12 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet du temps d'extraction et de la température sur le piégeage du radical DPPH.....	108
Figure II. 13 : Effet des facteurs d'extraction (A : concentration d'éthanol ; B : température ; C : temps d'extraction) sur le DPPH.....	112
Figure II. 14 : Profil du chromatogramme du mélange des étalons pour l'extraction conventionnelle (1) Acide gallique, (2) catéchine, (3) épicatechine, (4) acide caféique, (5) rutine, (6) quercétine.....	115
Figure II. 15 : Profil du chromatogramme du mélange des étalons pour l'extraction assistée par ultrasons (1) Acide gallique, (2) catéchine, (3) épicatechine, (4) acide caféique, (5) rutine, (6) quercétine.....	116

Figure II. 16 : Pouvoir antimicrobien de l'extrait éthanolique de <i>N. sativa</i> vis-à-vis « <i>Escherichia coli</i> » par la méthode des puits.....	121
Figure II. 17 : pouvoir antimicrobien de l'extrait éthanolique de <i>N. sativa</i> vis-à-vis « <i>Staphylococcus aureus</i> » par la méthode de disques.....	121
Figure II. 18 : Effet de l'extrait éthanolique <i>N. sativa</i> sur la cinétique de croissance de <i>E. coli</i>	125
Figure II. 19 : Effet de l'extrait éthanolique <i>N. sativa</i> sur la cinétique de croissance de <i>S. aureus</i>	125

Liste des tableaux

Partie I :

Tableau II. 01 : différents synonymes de *Nigella sativa* dans le monde 18

Tableau II. 02 : Paramètres pharmacocinétiques de la TQ chez le lapin suite à une seule dose extravasculaire de TQNLC (n=3)..... 30

Partie II :

Tableau I. 01 : Niveaux de conception expérimentale pour divers paramètres..... 63

Tableau I. 02 : La matrice du design Box – Behnken (BBD)..... 64

Tableau I. 03 : Généralités sur les bactéries utilisées 77

Tableau I. 04 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d’inhibition..... 82

Tableau II. 01 : Les conditions optimales du rendement d’extraction..... 94

Tableau II. 02 : Matrice de conception de Box – Behnken avec variables codées et valeurs mesurées..... 95

Tableau II. 03 : Analyse de la variance du modèle de régression pour le TPC et le DPPH..... 96

Tableau II. 04 : Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale de TPC..... 105

Tableau II. 05 : Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale de DPPH..... 112

Tableau II. 06 : Conditions optimales d’extraction conventionnelle de (TPC) et le DPPH..... 113

Tableau II.07 : Comparaison des conditions d'extraction, TPC et DPPH de chaque Technique. 114

Tableau II.08 : Le temps de rétention, coefficient de corrélation, limites de détection et de quantification et les équations de régression (n=3)..... 117

Tableau II.09 : Concentration des composés phénoliques détectés dans les graines de *N. sativa*..... 118

Tableau II.10 : Diamètre d’inhibition de l’extrait sur les souches bactérienne testées..... 121

Liste des abréviations

AA : Activité antioxydante

AG: Acide gallique

Abs: Absorbance

ANOVA: Analysis of variance

BBD: Box–Behnken design

°C : Degré Celsius

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMB : Concentration minimale bactéricide

CV : Coefficient de variation

DAD : Diode-Array Detection

DPPH : 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl

EAG : Équivalent acide gallique

EAU : Extraction assistée par ultrasons

HPLC : La chromatographie liquide à haute performance

Min : Minute

Mg : Milligramme

ML : Millilitre

MO : Micro-ondes

MS : Masse sèche

N.S : Nigella sativa

OMS : Organisation mondiale de la santé

OH : Groupe hydroxyle

PPT : Polyphénols totaux

R² : Coefficient de corrélation

RSM : Response surface methodology

TPC : Total phénolique content

UAE : Ultrasound assisted extraction

µl: Microlitre

US : Ultrasons

UV : Ultra-violet

Valeur-p : Valeur de probabilité

Valeur-f : Test de Fisher

***TABLE
DES MATIÈRES***

Table des matières

Dédicace	I
Remerciements	II
Abstract	IV
Résumé	V
ملخص	VI
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	X
Liste des abréviations	XI
Introduction générale	01
Références bibliographiques	05

Partie I : Rappels bibliographiques

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales et leurs usages

I.1. Introduction	06
I.2. Les plantes médicinales.....	06
I.2.1. Historique.....	07
I.2.2. Définition.....	08
I.3. Intérêt des plantes médicinales.....	08
I.4. Domaines d'application des plantes médicinales.....	09
I.5. Les plantes médicinales en Algérie.....	09
I.6. Formes d'utilisation et préparations des plantes.....	09
I.6.1. Parties utilisées.....	09
I.6.2. Modes de préparation.....	10
I.7. La cueillette et le séchage des plantes médicinales.....	11
I.7.1 La cueillette.....	11
I.7.2. Le séchage.....	12

I.7.3. Conservation et stockage.....	12
I.8. Les précautions d'emploi des plantes médicinales	13
I.9. Conclusion.....	13
Références bibliographiques.....	14

Chapitre II : *Nigella sativa*. L

II.1. Introduction	17
II.2. Étymologie.....	18
II.3. Description botanique de <i>Nigella sativa</i> L.....	18
II.4. Culture de <i>Nigella sativa</i> L.....	21
II.5. Obtention de l'huile de Nigelle.....	21
II.6. Composition de l'huile de la graine de <i>N. sativa</i>	22
II.6.1. Composition en lipides simples.....	23
II.6.2. Composition en lipides complexes.....	24
II.6.3. Composition en glucides.....	24
II.6.4. Composition en protides.....	24
II.6.5. Autres composés.....	25
II.7. Propriétés physico-chimiques de l'huile de <i>Nigella sativa</i>	25
II.8. Pharmacocinétique de <i>N. sativa</i>	28
II.8.1. Distribution de la thymoquinone	28
II.8.2. Interaction avec des composés	29
II.8.3. Paramètres pharmacocinétiques de la thymoquinone chargée dans des liposomes.....	29
II.9. Toxicité de <i>Nigella sativa</i>	30
II.9.1. Toxicité des graines et de l'huile de <i>Nigella sativa</i>	30
II.9.2. Toxicité de la thymoquinone	31
II.9.3. Toxicité chez l'homme	32
II.10. Conclusion	32
Références bibliographiques.....	34

Chapitre III : Les composés phénoliques, méthodes d'extraction, caractérisation et activité biologique

III.1. Introduction.....	38
--------------------------	----

Table des matières

III.2. Les composés phénoliques.....	38
III.3. Localisation des polyphénols	39
III.4. Propriétés chimiques des composés phénoliques	40
III.5. Extraction des composés phénoliques	41
III.5.1. Procédés traditionnels d'extraction.....	41
III.5.1.1. Définition	41
III.5.1.2 Mécanisme.....	42
III.5.2. Procédés innovants d'extraction.....	43
III.5.2.1 Les ultrasons	43
III.5.2.2. Mécanisme d'action.....	44
III.5.2.3. Effet des paramètres opératoires.....	45
III.5.2.3. Equipements de traitement.....	46
III.6. Méthodes de caractérisations des polyphénols	48
III.6.1. Etude par spectrophotométrie (UV-visible)	48
III.6.1.1. Principe.....	49
III.6.1.2. Appareillage.....	49
III.6.2. Etude par chromatographie.....	50
III.6.2.1. Principe	50
III.6.2.2 La chromatographie liquide haute performance (HPLC)	51
III.6.2.3. La chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC- MS)	51
III.7. Activité biologique des composés phénoliques.....	52
III.7.1. Activité antioxydante.....	52
III.7.2. Activité antimicrobienne.....	52
III.8. Conclusion.....	53
Références bibliographiques.....	54

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.1. Introduction.....	58
I.2. Matériel utilisé	58
I.2.1. Matériel végétal.....	58

I.2.2. Broyage du matériel végétal.....	59
I.2.3. Produits chimiques et réactifs.....	59
I.3. Méthodologie.....	60
I.3.1. Méthode d'optimisation.....	61
I.3.1.1. Plan d'expériences.....	61
I.3.1.2. La méthodologie de surface de réponse (RSM).....	61
I.3.1.3. Design Box-Behnken (BBD).....	61
I.3.1.4. Modèle mathématique postulé.....	62
I.4. Optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques.....	63
I.4.1. Extraction non-conventionnelle assistée par ultrason (EAU).....	64
I.4.1.1. Mode opératoire.....	65
I.4.1.2. Principe de fonctionnement.....	65
I.4.1.3 Effet de la concentration du solvant sur l'extraction des composés phénoliques.....	66
I.4.1.4 Effet de temps d'extraction sur l'extraction des composés phénoliques.....	66
I.4.1.5. Effet de la température d'extraction sur l'extraction des composés phénoliques.....	66
I.4.2. Extraction conventionnelle par décoction.....	68
I.5. Détermination du rendement d'extraction.....	68
I.6. Détermination de la concentration en composés phénoliques totaux (TPC).....	69
I.6.1. Principe.....	69
I.6.2. Mode opératoire.....	69
I.6.3. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	70
I.7. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH• (2,2-diphényle-1- picrylhydrazyle)	71
I.7.1. Principe.....	71
I.7.2. Mode opératoire.....	72
I.8. Méthodes d'analyses physicochimiques	73
I.8.1. Etude par chromatographie.....	73
I.8.2. Principe.....	73
I.8.3. La chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	73
I.8.4. Appareillage.....	73
I.8.5. Détermination du profil phénolique.....	74
I.8.6. Mode opératoire de l'analyse HPLC-UV.....	75

I.9. Evaluation de l'activité antibactérienne des graines de <i>N. sativa</i>	76
I.9.1. Généralités.....	76
I.9.2. Culture des bactéries.....	76
I.9.3. Les souches testées.....	77
I.9.4. Notion du bactériostatique et du bactéricide.....	77
I.9.4.1. L'effet bactériostatique.....	77
I.9.4.2. L'effet bactéricide.....	77
I.9.5. Activité antimicrobienne des extraits.....	78
I.9.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode d'aromatogramme.....	78
I.9.6.1. Principe.....	78
I.9.6.2. Mode opératoire.....	78
I.9.6.3. Préparation de l'inoculum.....	79
I.9.6.4. Ensemencement.....	79
I.9.6.5. Dépôt des disques.....	80
I.9.6.6. Les différentes concentrations d'extrait utilisées.....	81
I.9.6.7. Incubation et lecture.....	82
I.9.7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	82
I.9.7.1. Principe.....	82
I.9.7.2. Mode opératoire.....	83
I.9.7.3. Préparation des précultures.....	83
I.9.7.4. Préparation de l'inoculum.....	83
I.9.7.5. Préparation de l'extrait à tester.....	83
I.9.6.6. Détermination de la CMI par la méthode de microdilution.....	84
I.10. Conclusion.....	85
Références bibliographiques.....	86

Chapitre II : Résultats et discussions

II.1. Introduction.....	91
II.2. Détermination du rendement d'extraction.....	91
II.2.1. Influence du solvant sur le rendement d'extraction.....	92
II.2.2. Influence des ultrasons sur le rendement d'extraction.....	92
II.2.3. Influence de la température sur le rendement d'extraction.....	93

II.2.4. Influence du temps sur le rendement d'extraction.....	93
II.3. Ajustement de la variance du modèle et analyse statistique.....	94
II.4. Etude de l'optimisation d'extraction des composés phénoliques.....	99
II.4.1. Analyse de la surface de réponse des polyphénols totaux.....	99
II.4.2. Influence des variables d'extraction sur les polyphénols totaux.....	101
II.4.2.1. Effet du temps d'extraction sur les composés phénoliques totaux.....	103
II.4.2.2. Effet de la température sur les composés phénoliques totaux.....	103
II.4.2.3. Effet de la concentration du solvant sur les composés phénoliques totaux.....	104
II.4.3. Validation du modèle des polyphénols totaux.....	105
II.5. Etude de l'optimisation de l'activité antioxydante.....	106
II.5.1. Analyse de la surface de réponse du piégeage du radical DPPH.....	106
II.5.2. Influence des variables d'extraction sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH.....	108
II.5.2.1. Effet des ultrasons sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH.....	110
II.5.2.2. Effet de la concentration du solvant sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH.....	110
II.5.2.3. Effet de la température sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH.....	110
II.5.2.4. Effet du temps sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH.....	111
II.5.3. Validation de modèle de DPPH.....	112
II.6. Analyse des conditions d'extraction conventionnelle.....	113
II.7. Condition optimisée et comparaison avec la technique conventionnelle.....	114
II.8. Analyse chromatographique des composés phénoliques par HPLC.....	115
II.8.1. Chromatogramme des étalons.....	115
II.8.2. Identification et quantification des composés phénoliques.....	117
II.8.3. Analyse du profil phénolique.....	119
II.9. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	120
II.9.1. Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'extrait de <i>Nigella Sativa</i> par l'aromatogramme.	120
II.9.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de microdilution	123
II.10. Conclusion.....	126
Références bibliographiques.....	128
Conclusion générale et perspectives	134
Annexes	136

Introduction Générale

Introduction générale

Les plantes médicinales ont joué un rôle vital dans l'histoire de l'humanité en ce qui concerne la subsistance des populations et le maintien de la santé des individus, ce pendant de nombreuses décennies. Selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), on compte plus de 4000 espèces de plantes qui ont été identifiées pour leurs propriétés médicinales, représentant ainsi la base de 90 % de la médecine traditionnelle en Afrique. L'Algérie se démarque par sa riche diversité botanique, notamment en ce qui concerne les plantes autochtones médicinales, qui offrent des applications thérapeutiques particulièrement intrigantes [1].

Du fait de sa localisation géographique exceptionnelle, l'Algérie se trouve dans une position privilégiée qui se traduit par une grande diversité de climats, favorisant ainsi une faune riche et variée. Effectivement, les principales ressources végétales de ce pays s'étendent le long de ses côtes, dans ses plaines, montagnes, steppes, et même au cœur du Sahara. Ces ressources naturelles jouent un rôle vital, contribuant à la préservation de l'écosystème régional tout en étant cruciales pour l'économie de l'Algérie [2].

Au sein des plantes à vocation médicinale, on découvre la nigelle (*Nigella Sativa L.*), une plante qui a trouvé sa place dans la pharmacopée depuis plus de cinq millénaires. Ses précieuses graines et son huile ont servi à remédier à un large éventail de maux, allant des infections aux affections respiratoires, en passant par les migraines, et bien d'autres applications thérapeutiques. La nigelle, en plus de son utilisation culinaire, notamment dans la fabrication de pains et de pâtisseries, ainsi que comme élément décoratif, a suscité l'intérêt des chercheurs dès les années 1960. Ces premières études ont porté sur divers aspects de cette plante, y compris sa composition chimique, ses propriétés pharmacologiques, et leurs éventuelles applications en médecine humaine [3].

Au fil des décennies, des centaines d'études ont mis en évidence une multitude d'activités thérapeutiques liées aux huiles qu'elle renferme, qu'elles soient végétales ou essentielles, ainsi qu'à des composés tels que la thymoquinone. Les extraits de nigelle sont ainsi considérés comme une source potentielle de composés phénoliques aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires novatrices, qui pourraient présenter un profil de sécurité plus favorable que certains médicaments actuellement utilisés. En effet, ces derniers, en cas

d'utilisation prolongée, peuvent entraîner des effets secondaires graves, tels que des ulcères gastriques ou une dépression de la moelle osseuse, parmi d'autres complications [4].

Les composés phénoliques, ou polyphénols, forment l'un des groupes les plus prédominants parmi les composés présents dans les plantes, avec une distribution largement répandue, englobant au moins 8000 structures distinctes répertoriées. Ils sont le résultat du métabolisme secondaire des plantes et se distinguent par leur exceptionnelle capacité antimicrobienne et antioxydante, agissant de manière efficace comme des inhibiteurs de radicaux libres. Les polyphénols sont reconnus pour leur potentiel dans la prévention de diverses maladies chroniques, notamment les maladies cardiovasculaires, le cancer, l'ostéoporose, le diabète sucré, les maladies neurodégénératives. Ils sont également réputés pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antiathérogènes et antithrombotiques [5].

En ce qui concerne l'extraction des composés phénoliques, plusieurs méthodes ont été employées, notamment la macération, l'infusion et la décoction. Cependant, ces techniques sont chronophages et nécessitent d'importantes quantités de solvants organiques coûteux. Par conséquent, des facteurs tels que l'efficacité, le coût, la simplicité et la minimisation des pertes ont une influence significative sur le choix de la méthode d'extraction [6].

L'extraction assistée par ultrasons se démarque comme l'une des méthodes d'extraction non conventionnelles les plus sécuritaires, rapides et efficaces. Dans de nombreuses situations, l'application d'ultrasons permet de minimiser la dégradation des composés chimiques sensibles à la chaleur. Le processus d'extraction par ultrasons implique la rupture des parois cellulaires grâce à la formation et à l'éclatement de bulles provoquées par la cavitation sonore. Ce mécanisme améliore le transfert des composants cellulaires vers l'échantillon à extraire. De plus, il permet de réduire la quantité de solvant nécessaire, de gagner du temps, et d'optimiser le rendement d'extraction [7].

Concernant l'optimisation d'extraction, Les méthodes classiques consistent à ajuster une seule variable à la fois. Néanmoins, cette approche comporte des inconvénients tels que la consommation de temps et de ressources, ainsi que l'ignorance des effets synergiques potentiels. Pour pallier à ces problématiques, il est possible de se tourner vers des techniques statistiques multivariées, à l'instar de la méthodologie de surface de réponse (RSM) [8]. Cette approche repose sur des outils mathématiques et statistiques visant à ajuster une équation polynomiale aux données expérimentales, ce qui autorise l'évaluation simultanée de plusieurs

paramètres ainsi que de leurs interactions. L'atout majeur de la RSM réside dans sa capacité à réduire le nombre de cycles expérimentaux, ce qui engendre des économies d'énergie, de temps et de matières premières, tout en prenant en compte les interactions entre divers facteurs [9].

L'objectif de ce travail de thèse consiste à déterminer les conditions optimales d'extraction pour maximiser le rendement en polyphénols et la capacité antioxydante des graines de *Nigella sativa*, en appliquant la méthodologie de surface de réponse (RSM) basée sur le design Box-Behnken (BBD), en utilisant les facteurs indépendants à trois niveaux : la température (25, 50 et 75 °C), le temps (15, 30 et 45 min) et la concentration d'éthanol (30, 60 et 90 %). Les résultats obtenus ont également été comparés à ceux obtenus par la méthode conventionnelle.

Les extraits récupérés ont été analysés par la méthode de chromatographie à haute performance (HPLC) pour identifier et quantifier les différents composés phénoliques. Enfin, une évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique vis-à-vis deux souches microbienne *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* a été étudiée. Pour mener cette étude, notre travail est devisé en deux parties :

La première partie est consacrée à une étude bibliographique, repartie en trois chapitres :

Le premier chapitre présente une mise au point bibliographique décrivant les plantes médicinales et leurs usages à travers le monde. Le deuxième chapitre est consacré à une étude ethnobotanique sur la plante étudiée. Le troisième chapitre illustre une synthèse bibliographique sur les composés phénoliques, les nouvelles techniques d'amélioration de l'extraction qu'il est possible d'appliquer, leurs méthodes de caractérisation, ainsi que leurs activités biologiques.

La deuxième partie est consacrée aux expériences effectuées, leurs modes opératoires ainsi qu'aux matériels utilisés dans chaque expérience, aux analyses et à l'interprétation des résultats obtenus. Cette étude expérimentale est divisée en deux étapes :

La première étape est consacrée à l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques de la plante étudiée par deux méthodes (conventionnelle et non-

conventionnelle), évaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits et l'analyse chromatographique des composés phénoliques par HPLC.

La deuxième étape concerne une analyse approfondie ainsi que des interprétations et des discussions sur les résultats obtenus.

Enfin, la présente thèse est achevée par une conclusion générale qui récapitule les principaux résultats obtenus au cours de ce travail, ainsi que des perspectives envisagées.

Références bibliographiques

- [1] Hamza, N., Berke, B., Cheze, C., Agli, A. N., Robinson, P., Gin, H., & Moore, N. (2010). Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. *Journal of ethnopharmacology*, 128(2), 513-518.
- [2] Cheriti, A., Belboukhari, N., Sekkoum, K., & Hacini, S. (2006). Plants of Algerian semi-arid regions used for the treatment of gastro-intestinal disorders. *Alg. J. Arid Areas*, 5, 7-10.
- [3] Hebidi, M. (2019). Contribution à l'étude de la graine de nigelle ou cumin noir *Nigella sativa* L, 118.
- [4] Abdesselam, B. E. (2015). Approche ethnopharmacologique de *Nigella sativa* : de ses utilisations traditionnelles ancestrales aux études cliniques actuelles de ses principes actifs, 159.
- [5] Omodanisi, E. I., Aboua, Y. G., & Oguntibeju, O. O. (2017). Assessment of the anti-hyperglycaemic, anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanol extract of *Moringa oleifera* in diabetes-induced nephrotoxic male wistar rats. *Molecules*, 22(4), 439.
- [6] Varo, M. A., Jacotet-Navarro, M., Serratos, M. P., Mérida, J., Fabiano-Tixier, A. S., Bily, A., & Chemat, F. (2019). Green ultrasound-assisted extraction of antioxidant phenolic compounds determined by high performance liquid chromatography from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) juice by-products. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 1945-1955.
- [7] Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food chemistry*, 119(2), 851-858.
- [8] Zhao, Z. Y., Zhang, Q., Li, Y. F., Dong, L. L., & Liu, S. L. (2015). Optimization of ultrasound extraction of *Alisma orientalis* polysaccharides by response surface methodology and their antioxidant activities. *Carbohydrate polymers*, 119, 101-109.
- [9] Khanahmadi, M., Ghaffarzagdegan, R., & Khalighi-Sigaroodi, F. (2018). Optimization of the Glycyrrhizic Acid Extraction from Licorice by Response Surface Methodology. *Iran. J. Chem. Chem. Eng. Research Article* Vol, 37(1).

Partie I

Rappels Bibliographiques

Chapitre I

**Généralités sur les plantes
médicinales et leurs usages**

I.1. Introduction

Les bienfaits curatifs des plantes ont été reconnus depuis l'aube de l'humanité. Les premières traces écrites de la médecine à base de plantes remontent à une tablette d'argile portant des inscriptions en caractères cunéiformes, rédigée par les Sumériens il y a environ 3000 ans avant notre ère. Ce précieux savoir a été transmis de génération en génération, nos ancêtres s'efforçant autant que possible de le consigner par écrit. Aujourd'hui encore, malgré les avancées de la pharmacologie, l'utilisation thérapeutique des plantes médicinales demeure prépondérante, en particulier dans les pays en développement [1].

Les plantes médicinales, riches en composants aux vertus thérapeutiques, ont été utilisées depuis des siècles pour traiter diverses affections humaines. La phytothérapie, pratique ancienne, suscite aujourd'hui un regain d'intérêt, avec l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) révélant qu'environ 80% de la population mondiale recourt à la médecine traditionnelle pour ses besoins de soins de santé primaires. Cette tendance découle de facteurs tels que la pauvreté et l'inaccessibilité à la médecine moderne [2]. La découverte des bienfaits des plantes a été un processus graduel, facilité par l'évolution des interactions sociales, en particulier à partir de l'ère néolithique. L'observation, l'expérience et la transmission d'informations au fil du temps ont permis à certains individus de diagnostiquer des affections, d'identifier les plantes curatives et finalement de soigner les malades [3].

I.2. Les plantes Médicinales

Depuis des temps immémoriaux, l'humanité a constamment fait appel aux végétaux pour trouver les éléments essentiels de sa nutrition, de ses remèdes, et pour assurer sa survie. À l'échelle mondiale, plus de 20 000 espèces de plantes sont cultivées pour des usages variés, qu'il s'agisse d'assaisonnements, de médicaments, ou d'ingrédients cosmétiques. D'après le Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale, les plantes médicinales sont employées principalement en médecine et en pharmacie, mais elles trouvent également leur place en aromathérapie sous forme d'huiles essentielles, en cosmétique pour leurs propriétés, dans la lutte contre les moustiques, et même dans l'industrie, où certaines plantes servent d'extraits pour des désodorisants [4].

Les principales catégories de plantes aromatiques et médicinales qui bénéficient à l'humanité sont déterminées en fonction de leur usage prédominant, qu'il s'agisse de tisanes,

de produits cosmétiques, d'assaisonnements, d'aliments ou d'applications industrielles. Actuellement, l'intérêt pour la médication à base de plantes connaît une résurgence significative, grâce à des avancées scientifiques qui reposent sur des méthodes analytiques et de nouvelles expérimentations. C'est ainsi que le domaine médical découvre les bienfaits des prescriptions empiriques basées sur les plantes médicinales [5].

Le continent africain est riche en une grande diversité de plantes médicinales. En effet, parmi les 300 000 espèces végétales répertoriées dans le monde, plus de 200 000 de ces espèces prospèrent dans les régions tropicales d'Afrique et présentent des propriétés médicinales précieuses (figure I.01) [6].



Figure I. 01 : Plantes médicinales « feuilles, graines, tiges » [6]

I.2.1. Historique

Pendant des millénaires, l'humanité a exploité diverses plantes trouvées dans son environnement pour traiter une multitude de maladies. Ces plantes constituent une source inestimable de composés potentiels, en grande partie attribués aux métabolites secondaires. Ceux-ci se distinguent par leur grande diversité de structures chimiques et offrent un vaste éventail d'activités biologiques.

Ces dernières décennies, on a observé un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et de leurs utilisations traditionnelles dans différentes régions du monde, dans le cadre de la valorisation de la médecine traditionnelle. Cette démarche a révélé d'importants avantages économiques, à la fois en ce qui concerne le développement de la médecine

traditionnelle et l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement de diverses affections. Ainsi, il est devenu impératif de reconnaître et promouvoir la médecine traditionnelle [7].

L'exploration de la chimie des plantes reste d'une importance cruciale, même si cette discipline est ancienne. Cette pertinence continue découle principalement du fait que le monde végétal constitue une source inestimable d'une grande diversité de molécules bioactives [8].

I.2.2. Définition

Les plantes médicinales sont des végétaux qui trouvent leur utilisation dans la médecine traditionnelle, et au moins une partie d'entre elles renferme des propriétés médicales. Leurs effets bénéfiques découlent de la présence de composés chimiques, qu'ils soient métabolites primaires ou secondaires, ou de la coopération entre différentes substances contenues dans la plante. Ces plantes médicinales se caractérisent par la présence de parties telles que les feuilles, l'écorce, ou d'autres éléments organiques, qui peuvent revêtir des vertus curatives, mais qui peuvent aussi se révéler toxiques en fonction de la quantité utilisée. Elles sont fréquemment exploitées en phytothérapie en raison de leurs principes actifs, et leur accessibilité en herboristerie ou en pharmacie, avec ou sans ordonnance, dépend des réglementations propres à chaque pays [9].

I.3. Intérêts des plantes médicinales

La majorité des espèces végétales renferment des substances ayant la capacité d'influencer le corps humain et animal, et elles sont exploitées à la fois dans la médecine traditionnelle et en phytothérapie. Leur utilisation présente des avantages souvent absents des médicaments conventionnels [10].

Les plantes médicinales jouent un rôle crucial dans la recherche pharmaceutique et le développement de médicaments, que ce soit en tant qu'agents thérapeutiques directs, en tant que matière première pour la synthèse de médicaments, ou encore en tant que modèles pour la création de composés pharmaceutiques actifs. Cette importance repose sur le fait que les principes actifs extraits de plantes proviennent de processus biologiques répandus dans le règne vivant, tandis que la plupart des médicaments synthétiques sont des substances étrangères (xénobiotiques) dont les effets secondaires sont moins bien compris [11].

I.4. Domaine d'application des plantes médicinales

Les composés naturels dérivés des plantes présentent une variété d'applications importantes dans divers domaines, notamment l'industrie alimentaire, la cosmétologie, la dermatopharmacie et l'agriculture. Parmi ces composés, les métabolites secondaires, qui ont principalement fait leurs preuves en matière de thérapeutique, occupent une place prépondérante. En pharmacie, une proportion significative de médicaments est encore d'origine végétale, et la recherche explore constamment de nouvelles molécules actives dans les plantes, ainsi que des matières premières pour la semi-synthèse [12].

L'intérêt croissant pour l'utilisation des plantes médicinales, tant dans les pays développés que dans les pays en développement, est en constante progression, en grande partie en raison de leur capacité à traiter efficacement sans causer d'effets secondaires indésirables. C'est pourquoi la recherche de nouvelles substances actives issues des plantes demeure une démarche tout à fait pertinente [13].

I.5. Les plantes médicinales en Algérie

L'Algérie abrite une impressionnante diversité de plus de 600 espèces de plantes médicinales et aromatiques. Dans la région du Hoggar, on recense environ 300 espèces de plantes, dont plus d'un quart sont traditionnellement utilisées à des fins médicinales. Malheureusement, leur état de conservation est préoccupant en raison des effets néfastes de la sécheresse excessive, aggravée par les pratiques humaines malavisées. Il est pertinent de considérer les plantes médicinales comme une ressource naturelle renouvelable. Cela signifie que l'apparition et la disparition de ces plantes se produisent de manière périodique et continue, en harmonie avec les saisons et les cycles naturels [14].

I.6. Formes d'utilisation et préparations des plantes

I.6.1. Parties utilisées :

- Récoltez les plantes entières lors de leur période de floraison.
- Les feuilles devraient être cueillies une fois qu'elles ont atteint leur pleine maturité, de préférence avant le début de la floraison.

- Récoltez les fleurs et les rameaux fleuris juste avant que les fleurs ne s'épanouissent complètement.
- Pour les racines des plantes annuelles, effectuez la récolte à la fin de leur période de croissance végétative.
- Pour les racines des plantes bisannuelles, récoltez-les à la fin de la première année, pendant la période de repos, avant le début de la deuxième année de croissance.
- Les racines des plantes vivaces devraient être récoltées au cours de leur deuxième ou troisième année, avant qu'elles ne deviennent trop dures et ligneuses en raison de la lignification.
- Pour les fruits et les graines, effectuez la récolte une fois qu'ils ont atteint leur maturité, ou légèrement avant cette étape, si vous avez l'intention de les sécher.
- Les écorces des arbres doivent être récoltées pendant l'hiver, au début du printemps, ou durant la saison sèche.
- Les écorces des arbrisseaux doivent être cueillies après la saison chaude ou à la fin de la saison des pluies. Les préparations d'herboristerie sont disponibles sous diverses formes, adaptées à l'usage prévu [10].

I.6.2. Modes de préparation :

La méthode de préparation d'un produit de phytothérapie peut influencer la quantité de principe actif qu'il contient. Différentes méthodes sont employées en fonction de l'effet thérapeutique recherché :

- ✓ **Infusion** : Cette méthode consiste à verser de l'eau bouillante sur les parties de la plante, couvrir et laisser reposer de 2 à 15 minutes. Elle est adaptée aux parties fragiles de la plante, comme les fleurs et les feuilles.
- ✓ **Décoction** : La décoction implique de faire bouillir les parties de la plante dans de l'eau pendant 15 à 30 minutes. Elle convient aux parties plus résistantes de la plante, comme les écorces, les racines, les fruits et certaines feuilles.
- ✓ **Macération** : Cette méthode consiste à laisser la plante en contact avec de l'eau à température ambiante pendant 30 minutes à 4 heures.
- ✓ **Poudre** : La poudre est obtenue en broyant les parties sèches de la plante, suivie d'un tamisage.

- ✓ **Teinture** : Les teintures sont préparées à partir de poudres végétales sèches, avec un degré d'alcool variant en fonction du type de plante. Il peut être de 60° (pour les principes actifs très solubles), de 70°, de 80° ou de 90° (par exemple, pour les produits résineux et les huiles volatiles).
- ✓ **Extrait** : Les extraits sont obtenus en introduisant la plante dans une solution volatile (éther, eau, alcool...) en utilisant diverses méthodes d'extraction (macération, décoction, infusion). Ensuite, on évapore ces solutions pour obtenir une consistance fluide, molle ou sèche. Les extraits sont classés en fonction de leur consistance, tels que les extraits fluides, mous ou secs [15].

I.7. La cueillette et le séchage des plantes médicinales

I.7.1. La Cueillette

La qualité et les propriétés des plantes sont intrinsèquement liées à des facteurs tels que la région de leur croissance, le moment de leur récolte, ainsi que les méthodes employées pour les cueillir. La cueillette est étroitement influencée par les variations climatiques et saisonnières. Pour évaluer les caractéristiques d'une plante, il est impératif de prendre en compte des éléments tels que la partie de la plante utilisée, sa morphologie, sa couleur, sa nature et sa saveur [16].

La récolte des plantes doit se dérouler par temps sec, après le lever du soleil, une fois que la rosée a disparu. Il est crucial de sélectionner des zones non polluées pour la cueillette, et les plantes récoltées doivent être saines, exemptes de toute infestation d'insectes ou d'attaques fongiques. Le moment de la récolte varie en fonction de la partie de la plante :

- Les feuilles sont idéalement récoltées au printemps ou en été.
- Les fleurs doivent être cueillies au moment où elles commencent à s'ouvrir.
- Les fruits et les baies sont récoltés dès qu'ils atteignent leur pleine maturité.
- L'écorce est prélevée au printemps ou en automne.
- Les racines sont récoltées en automne [17].

I.7.2. Le séchage

Le processus de séchage vise à éliminer l'humidité des plantes, et la méthode de dessiccation est adaptée en fonction des parties de la plante à conserver. Par exemple, le séchage au soleil représente l'approche la plus simple et économique, principalement utilisée pour les racines, les tiges, les graines et les fruits [18].

En revanche, le séchage à l'ombre est préconisé pour les feuilles et les fleurs. En effet, les feuilles vertes qui sont séchées au soleil tendent à jaunir, tandis que les pétales de fleurs perdent leurs couleurs vives, ce qui pourrait altérer les propriétés médicinales de ces éléments. Les plantes aromatiques ne doivent pas demeurer exposées au soleil trop longtemps afin de ne pas perdre leur parfum [18,19].

Pour garantir un séchage optimal des plantes aromatiques ou des plantes contenant des huiles essentielles, il est recommandé de ne pas dépasser une température de 30°C. En d'autres cas, la plage de température pour la dessiccation peut varier entre 15 et 70°C [19].

I.7.3. Conservation et stockage

Les plantes médicinales requièrent une conservation minutieuse, loin de la lumière, de l'air, et à l'abri de l'humidité. Pour ce faire, on les place dans des contenants en porcelaine, faïence, verre teinté, boîtes en fer blanc hermétiques, sacs en papier, ou des caisses [20].

Cette démarche s'avère essentielle pour les plantes susceptibles de subir des altérations chimiques sous l'influence des rayons ultraviolets. Les plantes riches en composés volatils et sujettes à l'oxydation rapide nécessitent un stockage dans un environnement hermétique [21].

Lors de la conservation des plantes, il est primordial d'éliminer les parties inutilisables, puis de les sécher dans un endroit bien ventilé. Les racines doivent être séchées à l'air libre et protégées de l'humidité, tandis que les fleurs, les feuilles et les graines doivent être disposées en couches minces sur des supports ajourés pour le séchage [22].

I.8. Les précautions d'emploi des plantes médicinales

Bien que l'utilisation de plantes médicinales soit souvent aisée, il est essentiel de rester vigilant en ce qui concerne les possibles effets secondaires [23]. Certaines plantes peuvent devenir dangereuses si leur dosage n'est pas rigoureusement respecté. Par conséquent, il est fortement recommandé de consulter un professionnel de la santé, car une utilisation incorrecte de certaines plantes peut entraîner des conséquences potentiellement graves. Certaines de ces plantes, bien qu'elles jouissent d'une renommée positive, peuvent provoquer des effets indésirables, voire mortels, dans des circonstances particulières. En somme, il convient d'exercer la plus grande prudence lors de l'emploi de plantes médicinales [24].

I.9. Conclusion

Malgré l'expansion de l'industrie pharmaceutique qui produit des médicaments synthétiques, la médecine traditionnelle conserve sa place prépondérante en tant que source de remèdes de grande valeur. Elle reste solidement enracinée au sein des populations qui ont foi en ses pratiques, en particulier parmi ceux qui ne disposent pas des moyens financiers pour accéder à la médecine moderne.

Il convient de souligner que la médecine traditionnelle n'est pas uniquement une question de contraintes économiques, mais elle incarne également une tradition culturelle et une approche holistique de la santé. De plus, il est crucial de noter l'évolution actuelle vers la médecine douce et les pratiques médicales alternatives. Cette évolution traduit un intérêt croissant pour des traitements plus naturels, moins invasifs, et une vision de la santé qui prend en compte l'équilibre physique, mental et émotionnel.

Les approches complémentaires, comme l'herboristerie, l'acupuncture, la méditation, et d'autres formes de médecine traditionnelle, sont de plus en plus acceptées et intégrées dans les systèmes de soins de santé modernes.

Ainsi, la médecine traditionnelle demeure une ressource inestimable, tant pour ceux qui n'ont pas accès à des soins de santé modernes que pour ceux qui recherchent des alternatives naturelles et holistiques. Son rôle dans le maintien de la santé et du bien-être continue d'évoluer et de se renforcer, démontrant sa pertinence dans le monde contemporain.

Références bibliographiques

- [1] Sehad, S., & Zerrougui, R. (2016). Enquête ethnobotanique sur les plantes antidiabétiques auprès des herboristes et des guérisseurs de la Daïra de Draâ-El-Mizan (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- [2] Jiofack, T., Guedje, N., Ayissi, I., Fokunang, C., Usongo, L., & Nkongmeneck, B. A. (2010). Upper Nyong valley forest in Cameroon: Ethnobotanical uses and implications for biodiversity conservation. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 2(11), 370-381.
- [3] Fouché, J. G., Marquet, A., & Hambuckers, A. (2000). Les plantes médicinales de la plante au médicament ; Observatoire du Monde des Plantes ; Sart-Tilman, B77. B-4000 Liège.
- [4] HILAB, Amel. (2002). "Evaluation des activités antioxydantes et antibactériennes des extraits de quelques plantes médicinales (*Articum lappa*, *Costus indien*, *Curcuma longa*, *Glycyrrhiza glabra*, *Terminalia chebula*)." *Med*, p110.
- [5] Zohoun, T. H., & Flenon, J. (1997). La médecine traditionnelle et la pharmacopée africaines peuvent-elles constituer une alternative de soins face aux coûts prohibitifs actuels de la médecine moderne. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 9, 3-16.
- [6] Sofowora, A. (1993). *Medicinal plants and traditional medicine in Africa*. Spectrum Books Limited. Ibadan, Nigeria, 1-153.
- [7] Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., & Ignacimuthu, S. (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and ethnomedicine*, 2(1), 1-10.
- [8] Ferrari, J. (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud.ex A. Rich. Thèse de Doctorat, Université de Lausanne.
- [9] Ramli, I. (2013) -. Etude, in vitro, de l'activité anti leishmanienne de certaines plantes médicinales locales : cas de la famille des lamiacées. Thèse du magister en Biologie appliquée, Université de Constantine, 85p.
- [10] Iserin P., (2001) - Encyclopédie des plantes médicinales. Ed. Larousse-bordas, paris :275 p.
- [11] Bruneton, (2009) - Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales. Technique et documentation. Lavoisier 3ème édition 17(5) : 54-61 p.

- [12] Bahorun, T. (1997) Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research*, 83-94
- [13] Mohammedi, (2013) -Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie Thèse de Doctorat en Biologie. Université de Tlemcen Algérie. 170 p
- [14] Mokkadem A., (1999)- Cause de dégradations des plantes médicinales aromatique d'Algérie. *Revue vie et Nature* n°7, 24,26. N
- [15] Lyons, L., & Nambiar, D. (2000). Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivant avec le VIH. Publie par le Réseau communautaire d'info-traitements sida (CATIE).
- [16] Touzi, A., & Merzaia-Blama, A. (2008). La conservation des denrées agro-alimentaires par séchage dans les régions sahariennes. *Revue des Energies Renouvelables*, 8, 267-272.
- [17] Goetz, P. (2019). Ah! les vacances champêtres. *Phytothérapie*, 17(4), 175.
- [18] Boroze, T., Desmorieux, H., Méot, J. M., Marouze, C., Azouma, Y., & Napo, K. (2014). Inventory and comparative characteristics of dryers used in the sub-Saharan zone: Criteria influencing dryer choice. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40, 1240-1259.
- [19] Idlimam, A., Lamharrar, A., Kane, C. S. E., Akkad, S., & Kouhila, M. (2008). Valorisation de trois plantes médicinales par séchage solaire convectif en couches minces. *Revue des Energies Renouvelables, SMSTS*, 8, 151-156.
- [20] Normah, M. N., Chin, H. F., & Reed, B. M. (2013) "Conservation of tropical plant species". New York, NY, USA : Springer. (pp. 65-76)
- [21] Ouedraogo, S., Yoda, J., Traore, T. K., Nitiema, M., Sombie, B. C., Diawara, H. Z., & Semde, R. (2021). Production de matières premières et fabrication des médicaments à base de plantes médicinales. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(2), 750-772.
- [22] Ali, Muzamil, et al. "Climber plants: (2016) "medicinal importance and conservation strategies." *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers* : p101-138.
- [23] Rhattas, Mariam, Allal Douira, and Lahcen Zidane. (2016)"Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc)." *Journal of Applied Biosciences* 97: 9187-9211.

[24] Hachi, Maryama, et al. (2015) "Contribution a l'étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale utilisée au niveau de la ville de Khenifra (Maroc)/[contribution to the study and floristic ethnobotany flora medicinal use at the city of Khenifra (Morocco)]." International Journal of Innovation and Applied Studies 11.3: 754.

Chapitre II

Nigella sativa.L

II.1. Introduction

La famille des Ranunculaceae est une famille de plantes qui compte environ 1500 à 2000 espèces, regroupées en une soixantaine de genres différents. Parmi ces genres, certains ont déjà été étudiés pour leurs propriétés médicinales. Par exemple, les genres *Anemona* et *Aconitum* ont suscité un intérêt particulier dans le domaine médical [1].

Un autre genre de cette famille, *Nigella*, est largement utilisé comme condiment dans les pays méditerranéens et asiatiques. Cependant, l'espèce *Nigella sativa L.* a attiré une attention particulière en thérapeutique. Depuis plus de deux millénaires, cette plante est employée comme remède naturel, en particulier au Moyen-Orient et en Extrême-Orient. Son utilisation est fortement influencée par la parole prophétique, ce qui en fait un élément important de la médecine traditionnelle dans certaines cultures. Son utilisation remonte à des temps anciens, et ses applications thérapeutiques continuent d'être explorées et étudiées de nos jours, suscitant un intérêt croissant pour ses propriétés médicinales potentielles [2].

En effet, ces dernières années ont été marquées par la publication d'un grand nombre de travaux et d'études consacrés à la *Nigella sativa*. Ces recherches se sont particulièrement concentrées sur l'analyse de sa composition chimique ainsi que sur ses multiples propriétés pharmacologiques. Au fil du temps, ces centaines d'études ont mis en lumière une vaste gamme d'activités thérapeutiques associées aux graines de *Nigelle* et à leurs dérivés, tels que l'huile végétale et l'huile essentielle. Parmi les propriétés découvertes, on peut citer des effets antitumoraux, anti-infectieux et antidiabétiques, qui ont retenu une attention particulière. Un composé spécifique, la thymoquinone, s'est avéré être au cœur de nombreuses recherches en raison de son intérêt pour la santé. Ces découvertes ont contribué à confirmer les usages traditionnels de *Nigella sativa* (figure II.01) et ouvrent la voie à de nouvelles perspectives dans le domaine de la médecine naturelle [3].



Figure II.01 : Les graines de *Nigella Sativa.L* [4]

II.2. Etymologie

Le nom du genre "*Nigelle*" est étymologiquement lié au latin "niger" ou "nigellus," qui signifie "noirâtre." Cette appellation fait référence à la couleur caractéristique des graines de la plante, qui sont d'un noir profond. Le nom d'espèce "*Sativa*" provient également du latin et signifie "semé" ou "cultivé." En l'occurrence, *Nigella sativa* est une variété qui est spécialement cultivée en raison de ses graines comestibles et précieuses, utilisées à des fins culinaires comme épice, mais également pour des applications cosmétiques et médicinales [5].

Nigella Sativa L. est connue sous différents noms vernaculaires à travers le monde, reflétant sa diffusion géographique et son importance culturelle. Voici quelques exemples de ces noms vernaculaires, qui peuvent varier en fonction des régions et des langues et qui sont représentés dans le tableau II.01.

Tableau II.01 : différents synonymes de *Nigella Sativa.L* dans le monde

Pays	Synonyme de <i>N. sativa</i>
Algérie	Sanouj, Hebet el baraka, hebbah sauda
France	Cheveux de vénus, Nigelle, Poivrette
Espagne	Niguilla, Pasionara
Allemagne	Zwiebelsame, Schwarzkümmel
Angleterre	Devil in the bush, Love in the mist, Fennel flower, Onion seed
Italie	Nigella, Melanzis
Inde et Sri Lanka	Kalounji, Munga reala

Ces divers noms vernaculaires témoignent de la polyvalence et de l'importance de *Nigella sativa* dans différentes cultures, où elle est reconnue pour ses propriétés médicinales et culinaires depuis des siècles [6].

II.3. Description botanique de *Nigella Sativa. L*

La *Nigelle*, plante herbacée annuelle, se dresse fièrement jusqu'à une hauteur de 60 cm, arborant un feuillage luxuriant. Cette espèce est hermaphrodite et se compose d'éléments distincts tels que la tige, les feuilles, les fleurs, le fruit et les graines (Figure II.02 et II.03) [7].

- ✓ La tige, initialement dressée, se ramifie généreusement et acquiert une texture creuse avec l'âge, exhibant une gamme de teintes, du vert clair au vert foncé.
- ✓ Les feuilles, initialement d'un vert vif, adoptent des teintes brunes ou rouges en vieillissant. Elles sont finement découpées en petites lanières. Les feuilles inférieures sont courtes et pétales, tandis que les feuilles supérieures sont plus longues.
- ✓ La période de floraison s'étend d'avril à août. Les fleurs de la *Nigella sativa* sont remarquables par leurs cinq pétales, qui peuvent arborer une teinte blanche ou bleue. Leur diamètre varie de 20 à 35 mm. Ces fleurs solitaires émergent à l'extrémité des tiges. Elles affichent une teinte vert pâle lors de leur épanouissement, puis virent au bleu clair à maturité.
- ✓ Le fruit adopte une forme globuleuse sous la forme d'une capsule formée de 3 à 6 carpelles fusionnés à leur base. Chaque capsule contient plusieurs graines triangulaires, initialement blanchâtres, mais qui noircissent en mûrissant après exposition à l'air.
- ✓ Les graines de la *Nigella sativa* sont ovoïdes et mesurent entre 2 et 3,5 mm. Elles présentent de 3 à 4 arêtes et leur surface supérieure est finement granuleuse et réticulée. Ces graines, à la texture friable, possèdent une saveur épicée, et leur huile est riche, composée d'environ 60% d'acides gras insaturés et 30% d'acides gras saturés. Elles sont de petite taille, dépourvues de noyau, et arborent une base blanche imprégnée d'huile. Lorsqu'on les écrase, elles dégagent un parfum caractéristique de camphre [7,8].



Figure II.02 : La fleur et le fruit de *Nigella sativa. L* [9]

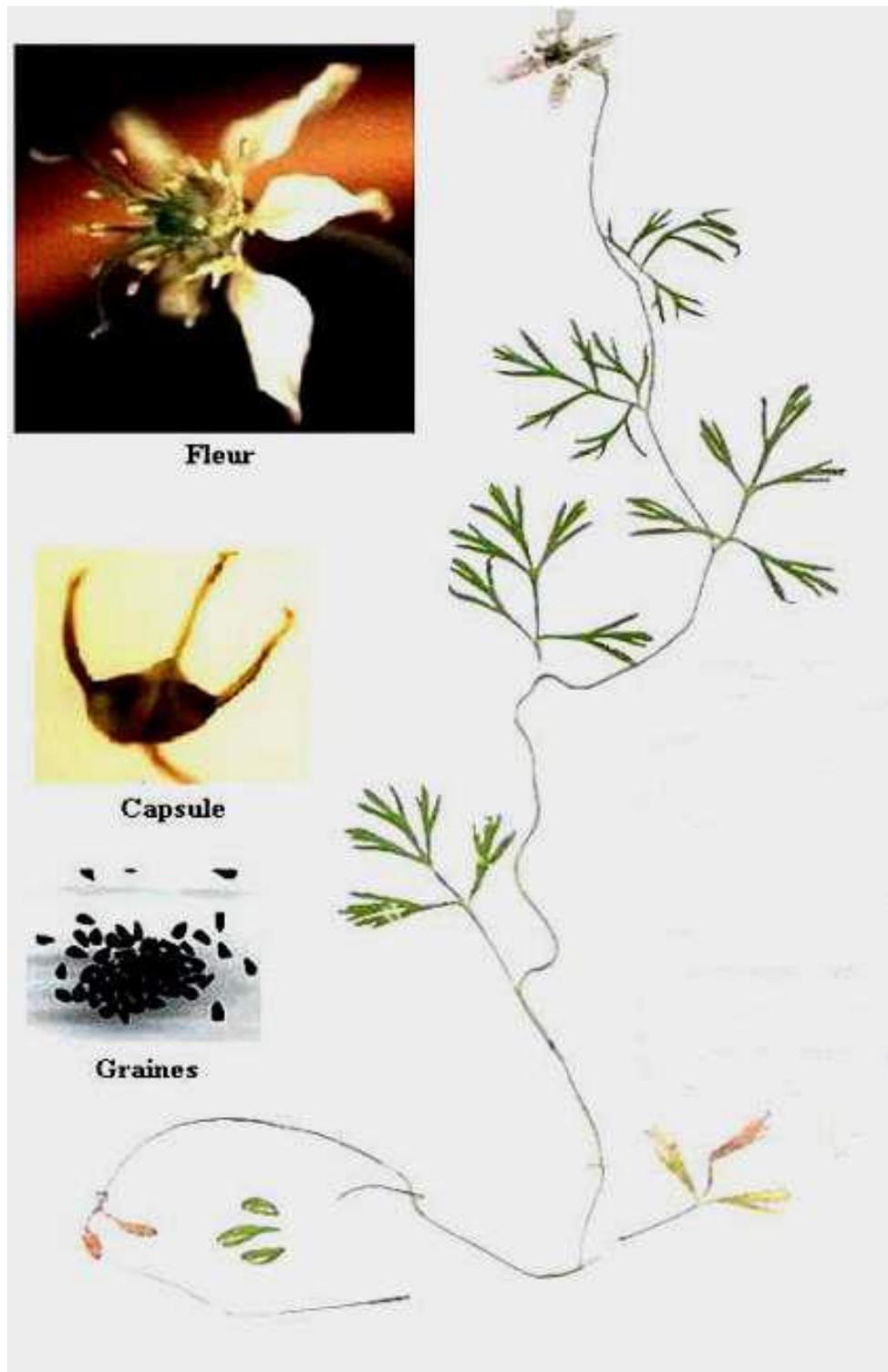


Figure II.03 : La plante entière de *Nigella Sativa.L* [9]

II.4. Culture de *Nigella Sativa.L*

Selon les recherches antérieures, la culture de la *Nigelle* requiert des soins particuliers :

- Semis sur place : Il est préférable de semer les graines de *Nigelle* directement dans le sol où vous souhaitez les cultiver. La *Nigelle* n'apprécie pas d'être transplantée, il est donc recommandé de la semer à l'emplacement final.
- Espacement : Les lignes de semis doivent être espacées d'environ 30 cm pour permettre un développement adéquat des plantes.
- Conditions d'éclairage : La *Nigelle* prospère en plein soleil, alors choisissez un emplacement bien ensoleillé pour la culture.
- Préparation du sol : Assurez-vous que le sol est riche en éléments nutritifs et qu'il soit bien drainé. Un sol de bonne qualité favorisera une croissance saine.
- Germination : Les graines de *Nigelle* germent généralement en 10 à 15 jours. Assurez-vous que le sol reste suffisamment humide pendant cette période.
- Période de floraison : La *Nigelle* commence à fleurir en juin et cette floraison se poursuit jusqu'en juillet.
- Récolte des graines : Vous pouvez récolter les graines en août. Laissez quelques-unes des fleurs produire des graines pour que de nouveaux plants apparaissent d'année en année.
- Entretien : Pour prolonger la période de floraison, veillez à retirer régulièrement les fleurs fanées au fur et à mesure [10].

II.5. Obtention de l'huile de *Nigella sativa*

L'intérêt thérapeutique de *Nigella sativa* repose principalement sur l'utilisation de son huile, qui est extraite des graines de la plante. Cette huile peut être obtenue de différentes manières, chacune ayant un impact sur sa qualité [11].

L'extraction de l'huile de *Nigelle* peut se faire par pression à froid, une méthode mécanique qui préserve au mieux la qualité de l'huile, ou par des techniques de pression à chaud, qui offrent un meilleur rendement, mais peuvent altérer certaines de ses propriétés. Une autre méthode consiste à extraire l'huile chimiquement en utilisant des solvants. Cependant, il est essentiel de noter que les huiles obtenues par des méthodes chaudes ou chimiques doivent être soumises à un processus de raffinage qui peut potentiellement réduire

leur qualité en éliminant certains de leurs composants bénéfiques. La qualité de l'huile de nigelle dépend fortement de la qualité des graines utilisées pour son extraction. Les conditions de culture jouent un rôle crucial à cet égard, notamment la qualité du sol, l'altitude, le climat, les techniques de culture et les mesures de prévention contre les parasites. De plus, les conditions de récolte sont essentielles. La maturité des graines, le mode de récolte et la sélection des graines sont autant de facteurs qui influencent la qualité de l'huile. Les méthodes d'extraction de l'huile ont un impact sur la préservation de ses propriétés médicinales. Le choix de la méthode d'extraction doit être soigneusement effectué pour garantir que les composants actifs de l'huile ne soient pas altérés.

Enfin, le conditionnement et la conservation de l'huile jouent un rôle majeur dans la préservation de sa qualité. Il est recommandé de stocker l'huile de nigelle dans des contenants en verre teinté, à l'abri de l'air et de la lumière. Idéalement, elle devrait être conservée dans un endroit frais pour éviter toute altération de ses propriétés [11,12].

II.6. Composition de l'huile de la graine de *N. sativa*

Diverses études consacrées à l'analyse de la composition de l'huile de *Nigelle* ont révélé sa grande richesse et diversité en termes de composés. En agrégeant les résultats de ces études, il a été recensé jusqu'à présent plus de 200 composés différents dans cette huile. Cependant, il est essentiel de noter que la composition de l'huile de nigelle peut varier d'une étude à l'autre. Cette variabilité s'explique par divers facteurs, notamment les lieux de récolte des spécimens de *Nigelle*, les conditions climatiques, les méthodes de culture et d'analyse, ainsi que d'autres paramètres. Ces variations témoignent de la complexité de la composition de l'huile de *Nigelle* [13].

Quantitativement, la plupart des composés identifiés dans l'huile essentielle de *Nigelle* sont présents en faibles proportions, soulignant la diversité de ses constituants chimiques. En ce qui concerne les graines de *Nigelle*, elles sont composées de lipides, de glucides et de protides. Les proportions de ces composés peuvent varier selon les études, mais elles demeurent dans un ordre de grandeur similaire.

En général, les graines contiennent entre 22,0% et 53,4 % de lipides, entre 23,5 % et 40 % de glucides, ainsi qu'entre 20,0 % et 31,2 % de protides. Les cendres représentent entre 3,7 % et 4,8 % de la composition des graines, tandis que l'humidité varie entre 2,6 % et 7,4 %.

Les graines renferment également des vitamines et divers minéraux. Le faible taux d'humidité dans les graines contribue à prolonger leur durée de conservation lors de leur conditionnement et de leur stockage, tout en réduisant les risques de contamination par des champignons [14].

II.6.1. Composition en lipides simples

Les lipides simples prédominent dans la composition de l'huile végétale de *Nigella sativa*, constituant environ 97 % de l'ensemble des lipides présents. En revanche, les lipides complexes, tels que les glycolipides et les phospholipides, représentent la part restante, soit environ 3 % de la composition totale de l'huile. Cette répartition des lipides dans l'huile de *N. sativa* contribue à sa richesse et à sa diversité en termes de composés lipidiques [15,16].

➤ **Glycérides (ou acylglycérols) :** L'huile de Nigelle est principalement composée de triglycérides, qui sont les lipides simples dominants et constituent environ 80 % de la composition totale de l'huile [17].

➤ **Acides gras libres :** Les acides gras insaturés représentent une proportion importante de l'huile de nigelle, constituant entre 70 % et 86 % de sa composition totale. Parmi les acides gras insaturés, l'acide linoléique est le composé principal, constituant entre 45,5 % et 70,8 % de ces acides. Il est suivi par l'acide oléique, qui représente entre 16,2 % et 25,0 % des acides gras insaturés. Enfin, on trouve un acide gras saturé, l'acide palmitique, à des taux variants entre 9,5 % et 18,4 % [17 - 19].

➤ **Stérols et esters de stérols :** Les stérols se trouvent dans les huiles végétales sous deux formes : libre à hauteur de 63 % et estérifié à hauteur de 37 %. Dans l'huile de *N. sativa*, le taux de phytostérols libres est estimé entre 0,2 % et 1 % de la composition totale en lipides. Selon diverses études analytiques, on identifie environ une vingtaine d'espèces de phytostérols réparties en trois catégories : les stérols, les 4-méthyl stérols et les alcools triterpéniques [19-20]. Le β -sitostérol prédomine parmi les stérols dans la plupart des huiles végétales. Quant aux phytostérols estérifiés, ils sont généralement liés à des lipides en C16 (acide palmitique) et en C18 (acides oléiques et linoléiques) [18 - 21].

➤ **Tocophérols :** L'huile végétale de *N. sativa* contient toutes les espèces de tocophérols [22-23]. Ils représentent environ 0,021 % de la composition totale en lipides. L' α -tocophérol et le γ -tocophérol sont les espèces prédominantes. La quantité totale de tocophérols dans cette huile (597 mg/kg) se situe dans la fourchette généralement observée dans d'autres huiles (entre 500 et 1500 mg/kg) [23,24].

II.6.2. Composition en lipides complexes

➤ **Glycolipides :** Une équipe de recherche à réaliser une séparation complète des glycolipides présents dans l'huile de Nigelle en utilisant la technique de chromatographie sur gel de silice. Cette analyse a permis d'identifier un taux de glycolipides de 2,59 g pour chaque 100 g d'huile. Au sein de cette catégorie, six sous-classes distinctes ont été identifiées, dont le diagalactosyldiacylglycérol était le composé majoritaire, représentant 55,6 % de la composition, suivi du cérébroside à hauteur de 11,9 % [22]. De manière générale, le profil des acides gras au sein de ces sous-classes est similaire. L'acide linoléique est l'acide gras dominant, suivi de près par l'acide oléique et l'acide palmitique. Parmi les stérols identifiés, six types ont été répertoriés, notamment le stigmastérol, le β -sitostérol, le Δ 5-avénastérol, le Δ 7-avénastérol, le campestérol et l'isofucostérol [18,21,22]. En ce qui concerne les composants glucidiques, seuls le glucose et le galactose ont été détectés. En se basant sur les besoins nutritionnels quotidiens de l'être humain, Haut du formulaire [24].

➤ **Glycérophospholipides :** L'huile de Nigelle est riche en glycérophospholipides, avec la phosphatidylcholine en tant que sous-classe majoritaire, représentant environ 46 à 48 % de sa composition lipidique. Elle est suivie par la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol. Bien que présents en quantités plus faibles, on a également isolé le phosphatidylglycérol, la lyso-phosphatidyléthanolamine et la lyso-phosphatidylcholine. En ce qui concerne les acides gras, l'huile de Nigelle est caractérisée par des taux élevés d'acides linoléiques, oléiques et palmitiques dans ses différentes fractions [22].

II.6.3. Composition en glucides

Dans une récente étude portant sur le métabolisme des graines de *Nigella sativa*, des chercheurs ont observé une augmentation initiale des taux de certains glucides, tels que l'arabinose, le lyxose et la xylose, au début du développement des graines. Par la suite, ces taux diminuent pour céder la place à d'autres types de glucides, notamment le galactinol et la raffinose, dont la présence est associée à l'étape de dessiccation des graines [25].

II.6.4. Composition en protides

L'huile de *Nigelle* contient un total de 18 acides aminés, parmi lesquels se trouvent tous les acides aminés essentiels : alanine, cystine, acide aspartique, acide glutamique, phénylalanine, glycine, histidine, isoleucine, lysine, leucine, méthionine, proline, arginine, sérine, thréonine, valine, tryptophane et tyrosine [15,26].

En 2009, une équipe de chercheurs russes a réussi à isoler de graines de *Nigella sativa* une protéine de transport des lipides appelée Ns-LTP1. Cette protéine présente une masse moléculaire de 9602 Da et contient 8 résidus cystéines qui forment 4 ponts disulfures. Il a été suggéré que cette protéine avait la capacité de supprimer le développement de certains champignons et oomycètes, ce qui souligne son potentiel dans des applications liées à la protection des cultures [27].

II.6.5. Autres composés

➤ **Éléments minéraux :** L'huile de *Nigelle* renferme une variété d'éléments minéraux, tels que le potassium (783 et 708 mg/kg), le magnésium (235 et 260 mg/kg), le phosphate (48,9 et 51,9 mg/kg), le sodium (20,8 et 18,5 mg/kg), le fer (8,65 et 9,42 mg/kg), le zinc (8,04 et 7,03 mg/kg), le manganèse (4,43 et 3,37 mg/kg) et le cuivre (1,65 et 1,48 mg/kg). Plus récemment, une étude a souligné que les graines de *N. sativa* étaient particulièrement riches en potassium (823 mg/100g), suivi du calcium (160 mg/100g), du magnésium (80 mg/100g) et du fer (65 mg/100g). On y trouve également des quantités moindres de zinc (2,5 mg/100g), de manganèse (1,5 mg/100g) et de cuivre (0,9 mg/100g) [14]. Plusieurs autres études ont également détecté la présence de sélénium. Les variations dans les résultats obtenus peuvent être attribuées à divers facteurs environnementaux présents dans les zones de production, aux cultivars employés pour produire les graines, ainsi qu'aux méthodes différentes utilisées pour préparer ces dernières [28].

➤ **Vitamines :** L'huile de *Nigelle* contient un éventail de vitamines, parmi lesquelles on peut citer la présence de rétinol (vitamine A), d'acide ascorbique (vitamine C), de thiamine (vitamine B1), de riboflavine (vitamine B2), de niacine (vitamine B3), de pyridoxine (vitamine B6), d'acide folique (vitamine B9), ainsi que divers dérivés du tocophérol (vitamine E) [18,22,28].

II.7. Propriétés physico-chimiques de l'huile de *Nigella sativa*

Les investigations menées par diverses équipes de recherche sur les caractéristiques physico-chimiques de l'huile de *Nigelle*, en comparant deux méthodes d'extraction, à froid et par solvant, ont révélé des différences notables dans plusieurs paramètres [13,20].

➤ **Point de fusion :** La température de solidification de l'huile de *Nigelle* est plus élevée lors de l'extraction à froid (-1,7 °C) que lors de l'extraction par solvant (-3,3 °C).

➤ **Couleur :** L'huile extraite par la méthode à froid présente une teinte jaune dorée, tandis que celle extraite à l'aide de solvants tend à adopter une nuance brun-jaune. Cette variation de

couleur découle de la capacité des solvants organiques à extraire davantage de pigments liposolubles et d'oléorésines présents dans les graines de *Nigelle*. En outre, la teinte jaune est un indicateur de la présence plus prononcée de pigments jaunes, notamment les caroténoïdes, comme précédemment mentionné.

➤ **Contenu en chlorophylle :** Ce paramètre revêt une grande importance, étant donné sa relation avec la couleur de l'huile, un attribut fondamental pour évaluer sa qualité. Selon une étude portant sur deux variétés de *Nigella sativa*, les taux de peroxyde ont été mesurés à 2,26 ppm et 6,04 ppm.

➤ **Absorption UV :** L'huile de *Nigelle* a la capacité d'absorber les rayonnements hors du spectre visible, y compris les UV-C (100-290 nm), les UV-B (290-320 nm) et les UV-A (320-420 nm). Par conséquent, elle pourrait être un agent de protection efficace contre les radiations UV, offrant un facteur de protection solaire (FPS) élevé. De plus, elle pourrait jouer un rôle essentiel dans la prévention des dommages cutanés liés aux UV-A, qui sont responsables du stress oxydatif, ainsi que des UV-B. L'huile de Nigelle présente une transmission optique similaire à celle des huiles de graines de datte et de framboise, ainsi qu'à des produits contenant du dioxyde de titane, couramment utilisés comme protection solaire contre les UV-B (FPS) et les UV-A.

➤ **Densité spécifique :** Le coefficient de densité est une mesure qui exprime la densité d'une substance par rapport à celle d'une substance de référence, généralement de l'eau pour les liquides. Dans ce cas, il a été évalué à 0,911 pour l'extraction à froid et à 0,921 pour l'extraction par solvant. Ces valeurs sont cohérentes avec celles précédemment rapportées (0,904 et 0,923).

➤ **Indice de réfraction :** Le coefficient de réfraction est une mesure de la façon dont la lumière est déviée en passant à travers une substance. À 20 °C, ce coefficient est de 1,4732 pour l'extraction à froid et de 1,4721 pour l'extraction par solvant, des valeurs qui sont similaires à d'autres données rapportées.

➤ **Indice d'iode :** L'indice d'iode est une mesure de la quantité d'iode qui est absorbée par une substance chimique. Cet indice est utilisé pour déterminer le degré d'insaturation des acides gras contenus dans une matière grasse. En effet, les doubles liaisons présentes dans les acides gras réagissent avec les composés iodés. Un indice d'iode plus élevé indique la présence d'un plus grand nombre de liaisons insaturées dans la matière grasse. Dans ce cas, l'indice d'iode est de 115 pour l'extraction à froid et de 128 pour l'extraction par solvant, des valeurs qui sont cohérentes avec d'autres études précédemment rapportées, lesquelles estimaient l'indice d'iode entre 107 et 129.

- **Indice de saponification :** L'indice de saponification représente la quantité d'hydroxyde de potassium (exprimée en milligrammes) nécessaire pour saponifier 1 gramme de matière grasse. Les acides gras à longue chaîne ont généralement un indice de saponification plus bas car ils contiennent relativement peu de groupes carboxyliques par unité de masse d'acide, par rapport aux acides gras à chaînes courtes. Dans ce cas, l'indice de saponification est de 192 pour l'extraction à froid et de 203 pour l'extraction par solvant.
- **Contenu en acides gras libres et indice de peroxyde :** Ces deux indicateurs sont des mesures de la qualité d'une huile. Dans le cas de l'extraction à froid, la valeur de peroxyde est de 13,5 meq/kg, tandis que pour l'extraction par solvant, elle s'élève à 10,7 meq/kg. Il est à noter que ces valeurs se situent au-dessus de celles rapportées par Salem (7,6 - 10,6 meq/kg) et en-dessous de celles rapportées par Attia (14,8 - 18,1 meq/kg).
- **Teneur en insaponifiable (PMI) :** Le pourcentage d'acides gras libres dans les huiles végétales revêt une importance capitale en ce qui concerne leur capacité à agir comme antioxydants naturels, contribuant ainsi à minimiser l'oxydation de l'huile lors de sa manipulation et de son stockage. Pour l'extraction à froid, ce pourcentage a été évalué à 1 %, tandis qu'il atteint 1,8 % pour l'extraction par solvant. Cette différence s'explique en grande partie par la technique d'extraction elle-même : l'huile extraite par solvant est plus riche en PMI (Potentiels de Membrane Initiale) que celle obtenue à froid. En effet, les solvants présentent une capacité accrue à extraire des composants associés aux lipides, tels que les phospholipides, les stérols, les vitamines liposolubles, les sucres et les pigments.
- **Stabilité oxydative :** La mesure de cet indice est essentielle pour évaluer la qualité des huiles, car elle permet d'estimer leur tendance à subir une oxydation dégénérative, qui est la principale cause de leur détérioration.
- **Viscosité :** La viscosité d'une huile est une mesure de sa résistance à l'écoulement, c'est-à-dire de sa fluidité. Plus une huile est visqueuse, plus elle est épaisse et résiste à l'écoulement, tandis qu'une huile peu visqueuse s'écoule plus facilement. Dans le cas de l'huile de graines de nigelle, sa viscosité est notablement inférieure à celle de la plupart des autres huiles végétales, ce qui signifie qu'elle est très fluide et coule facilement. Cette caractéristique peut avoir un impact sur son utilisation et sa manipulation, notamment dans l'industrie alimentaire, la cosmétique et d'autres applications [20].

II.8. Pharmacocinétique de *N. sativa*

Il y a un nombre limité d'études publiées à ce jour concernant les propriétés pharmacocinétiques de *Nigella sativa*, en particulier celles de la thymoquinone. Les propriétés pharmacocinétiques se réfèrent à la manière dont un composé ou un médicament est absorbé, distribué, métabolisé et excrété par l'organisme.

Dans le cas de *Nigella sativa*, ces études visent à comprendre comment ses composés actifs, comme la thymoquinone, sont traités par le corps. L'absence d'études pharmacocinétiques approfondies peut être due à plusieurs facteurs, notamment le manque d'intérêt de la part de la communauté scientifique, les défis liés à la recherche sur des composés naturels complexes, ou le coût élevé de telles études. Cependant, des recherches supplémentaires dans ce domaine pourraient contribuer à mieux comprendre comment les composés de *Nigella sativa* interagissent avec l'organisme et à optimiser leur utilisation à des fins thérapeutiques [13].

II.8.1. Distribution de la thymoquinone

L'analyse par HPLC révèle que la thymoquinone a la capacité de se lier aux protéines plasmatiques. Plus précisément, la concentration de thymoquinone libre dans le sérum est de 2,5 % à une concentration de 10 µg/mL et augmente à 72 % à une concentration de 100 µg/mL. Cette observation suggère que, à faible concentration, de nombreux sites de liaison irréversible sont disponibles pour la thymoquinone, ce qui explique sa faible détection dans le sérum. En revanche, à des concentrations plus élevées, tous les sites de liaison sont saturés, et la thymoquinone se retrouve en grande quantité sous forme libre. Lorsqu'il s'agit de la liaison de la thymoquinone aux protéines plasmatiques majeures, il a été constaté qu'elle se lie à hauteur de $94,5 \pm 1,7$ % à la sérum albumine bovine, de manière covalente, spécifiquement au niveau de la cystéine-34. De plus, la thymoquinone se lie à hauteur de $99,1 \pm 0,1$ % à l' α -1-glycoprotéine acide [29].

Une autre étude a également montré que la thymoquinone se lie à la sérum albumine humaine. Selon des études thermodynamiques, le complexe formé est principalement le résultat d'interactions hydrophobes. En utilisant des composés tels que la warfarine et l'ibuprofène dans des expériences de déplacement, il a été suggéré que la thymoquinone pourrait se lier au site I de l'albumine, ce qui est en accord avec les résultats de l'étude de modélisation moléculaire [30].

II.8.2. Interaction avec des composés

Une étude portant sur les effets d'extraits de *Nigella sativa* sur les activités métaboliques des enzymes CYP3A4 et CYP2D6 dans les microsomes de foie humain et chez des sujets sains a révélé que *N. sativa* inhibe de manière significative le métabolisme du dextrométhorphan par le biais du CYP2D6, avec une inhibition de 80 % du métabolite dextrorphan à une concentration de 100 µg/mL. De plus, elle a également montré une inhibition du métabolisme par le CYP3A4, avec une inhibition de 60 % du métabolite 3-méthoxymorphinane à la même concentration. Ces résultats suggèrent que *N. sativa* possède un potentiel d'interagir avec les substrats des enzymes CYP3A4 et 2D6, ce qui peut affecter le métabolisme de certains médicaments [31].

Dans une autre étude, *N. sativa* a été observée pour son impact sur la pharmacocinétique de la ciclosporine chez des lapins. Il a été constaté que *N. sativa* modifie la biodisponibilité de la ciclosporine par voie orale, ce qui se traduit par une diminution du pic de concentration (C_{max}) et de l'aire sous la courbe (AUC). Cette modulation des activités des enzymes CYP3A et de la protéine P-glycoprotéine (P-gp) peut influencer l'absorption et le métabolisme de la ciclosporine, un médicament immunosuppresseur couramment utilisé. Par conséquent, cela suggère que *N. sativa* peut avoir des interactions potentielles avec des médicaments comme la ciclosporine, affectant ainsi leur efficacité et leur sécurité d'utilisation [32].

II.8.3. Paramètres pharmacocinétiques de la thymoquinone chargée dans des liposomes

Une étude menée en juin 2013 sur des lapins a examiné les effets de la thymoquinone encapsulée dans des liposomes NLC (Nanostructured Lipid Carriers). Les résultats de cette étude sont représentés dans le tableau II. 02.

Tableau II.02 : Paramètres pharmacocinétiques de la TQ chez le lapin suite à une seule dose extravasculaire de TQNLC (n=3)

Paramètres	TQNLC 10 mg/kg
T_{max} (h)	3,96 ± 0,19
C_{max} (ng/mL)	4811,33 ± 55,52
AUC (ng.h/mL)	26821,61 ± 9,40
V_d (L/kg)	4,32 ± 0,34
CL (L/h/kg)	0,71 ± 0,031
t_{1/2} (h)	4,4933 ± 0,015

Selon les résultats obtenus, les chercheurs concluent que la thymoquinone est adaptée pour une administration extravasculaire, et les Nanostructured Lipid Carriers (NLC) pourraient représenter des vecteurs prometteurs pour son administration par voie orale [33].

II.9. Toxicité de *Nigella Sativa*

II.9.1. Toxicité des graines et de l'huile de *Nigella Sativa*

Les données provenant de divers paramètres et études suggèrent que *Nigella sativa* (nigelle) est non toxique. Cela est étayé par des indicateurs tels que les valeurs de DL₅₀ (dose létale médiane), la stabilité des enzymes hépatiques et l'intégrité des organes. Ces résultats suggèrent qu'il existe une large marge de sécurité pour l'utilisation de doses thérapeutiques de l'huile végétale de *N. sativa*. En d'autres termes, la plante ne semble pas provoquer de toxicité significative à des doses couramment utilisées à des fins thérapeutiques [34-37].

➤ **DL₅₀ (Dose Létale Médiane)** : La DL₅₀ est une mesure de la toxicité d'une substance, indiquant la dose à laquelle la moitié des individus exposés à la substance meurent. Dans le cas de la nigelle, les études ont révélé que les doses nécessaires pour provoquer une toxicité sévère ou la mort chez les animaux de laboratoire étaient relativement élevées. Cela indique que la plante a une faible toxicité aiguë.

- **Stabilité des enzymes hépatiques** : Les enzymes hépatiques, comme l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT), sont souvent utilisées comme indicateurs de la santé du foie. Des études ont montré que l'administration de *N. sativa* n'entraînait pas de perturbations majeures de ces enzymes, ce qui suggère que le foie n'est pas fortement affecté par la plante.
- **Intégrité des organes** : Les examens post-mortem d'animaux ayant reçu des doses de *N. sativa* n'ont généralement pas révélé de dommages significatifs aux organes tels que le foie, les reins, le cœur, etc. Cela indique que la plante n'entraîne pas de dommages organiques graves.
- **Large marge de sécurité** : Globalement, ces résultats suggèrent que la Nigelle présente une large marge de sécurité, ce qui signifie qu'elle peut être utilisée à des doses thérapeutiques sans provoquer de toxicité significative chez l'homme [35,37].

II.9.2. Toxicité de la thymoquinone

La thymoquinone subit un processus de métabolisation *in vivo*, se transformant en radicaux hydroquinones ou semiquinones grâce à l'action des oxydoréductases cellulaires, ce qui peut conduire à la production de radicaux libres oxygénés (ROS). Cette voie métabolique soulève des préoccupations quant à d'éventuels effets indésirables.

Lorsqu'administrée par voie orale dans un modèle de toxicité aiguë, la thymoquinone a montré une DL₅₀ de 2,4 g/kg chez les souris. À des doses élevées, cela a été associé à une diminution de l'activité physique et à des difficultés respiratoires. De plus, 24 heures après l'administration de la thymoquinone, des altérations ont été observées au niveau de certains organes tels que le foie, les reins et le cœur. Il y avait également une diminution des niveaux de glutathion réduit (GSH) dans le corps, et des marqueurs sanguins tels que l'urée, la créatinine, ainsi que les activités enzymatiques de l'ALAT, de la LDH et de la CPK ont présenté des augmentations significatives. Une autre étude a rapporté une DL₅₀ de 870,9 mg/kg chez les souris et de 794,3 mg/kg chez les rats [38-39].

Lorsque la thymoquinone a été administrée par voie intrapéritonéale, des doses supérieures à 50 mg/kg se sont avérées létales pour les souris, avec une DL₅₀ de 90,3 mg/kg. [39] Des études plus récentes ont calculé une DL₅₀ de 104,7 mg/kg chez les souris et de 57,5 mg/kg chez les rats pour cette voie d'administration. Une autre étude a suggéré une DL₅₀ de 10 mg/kg par voie intrapéritonéale chez les rats.

Ces valeurs de DL₅₀, qu'elles résultent de l'administration orale ou intrapéritonéale, sont significativement plus élevées (de 10 à 15 fois et même 100 à 150 fois plus élevées) que

les doses de thymoquinone rapportées pour ses effets bénéfiques dans le traitement de l'inflammation, son action antioxydante et son potentiel anticancéreux. Ces constatations suggèrent une marge thérapeutique significative pour la thymoquinone, avec une dissociation marquée entre ses effets bénéfiques et ses éventuels effets toxiques [39,40].

Dans une étude portant sur la toxicité chronique de la thymoquinone chez les souris, l'administration de la substance par voie orale dans l'eau de boisson à des concentrations allant jusqu'à 0,03 % pendant 90 jours n'a montré aucun signe de toxicité chronique, à l'exception d'une diminution significative de la glycémie à jeun [40]. De plus, une étude de phase I menée chez l'homme a montré que des doses journalières de 2600 mg de thymoquinone étaient bien tolérées, confirmant la relative sécurité de ce composé, en particulier lorsqu'il est administré par voie orale chez les animaux.

II.9.3. Toxicité chez l'homme

Deux incidents de dermatite de contact allergique ont été signalés, impliquant des individus souffrant d'eczéma maculopapulaire après l'application d'un produit topique contenant de l'huile essentielle de *Nigella sativa*. Heureusement, ces cas ont pu être traités efficacement en ayant recours à des corticostéroïdes [41]. Une note paradoxale réside dans le fait que cette huile est commercialisée pour ses prétendus bienfaits dans le traitement de divers problèmes cutanés, tels que les affections inflammatoires, l'acné et l'eczéma [42].

II.10. Conclusion

Nigella sativa, également connue sous le nom de nigelle, est une plante aux propriétés pharmacologiques remarquables. Son utilisation a une histoire qui remonte à plus de deux mille ans dans les cultures orientales, où elle était d'abord utilisée comme épice, puis comme remède. Ses bénéfices pour la santé sont attribués en grande partie à son composant actif, la thymoquinone.

La thymoquinone agit sur une variété de cibles biologiques, lui conférant un large spectre d'activité thérapeutique. Bien que les mécanismes d'action précis de la thymoquinone ne soient pas encore complètement compris, des preuves substantielles suggèrent qu'elle peut jouer un rôle important dans la prévention et le traitement de diverses affections.

Parmi les domaines où la nigelle montre un potentiel prometteur, on peut citer la prévention du cancer, la régulation des maladies métaboliques, la lutte contre les infections, la protection contre les maladies cardiovasculaires, la gestion des maladies gastro-intestinales, la

préservation de la santé hépatique et rénale, ainsi que la réduction des risques de maladies neurologiques. La graine de nigelle contient une multitude de composés, certains étant encore à l'étude, et la combinaison de ces constituants pourrait expliquer la diversité des activités pharmacologiques de la plante. Bien que toutes les applications potentielles de la nigelle n'aient pas encore été pleinement développées, elle est déjà commercialisée sous forme de complément alimentaire, notamment sous forme de gélules d'huile végétale, avec des allégations d'activité immunomodulatrice. Cela souligne le potentiel de cette plante en tant que ressource naturelle pour la promotion de la santé humaine.

Enfin, il est important de noter que la Nigelle semble être relativement sûre, en particulier lorsqu'elle est administrée par voie orale, avec une marge thérapeutique significative par rapport à ses éventuels effets indésirables.

Références bibliographiques

- [1] Burits, M., & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, 14(5), 323-328.
- [2] Elbeshehy, Essam KF. (2017) "Inhibitor activity of different medicinal plants extracts from *Thuja orientalis*, *Nigella sativa* L., *Azadirachta indica* and *Bougainvillea spectabilis* against Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infecting *Citrullus lanatus*." *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31.2: 270-279.
- [3] Sayeed, Muhammad Shahdaat Bin, et al. (2013) "The effect of *Nigella sativa* Linn. seed on memory, attention and cognition in healthy human volunteers." *Journal of Ethnopharmacology* 148.3: 780-786.
- [4] Cumin noir - *Nigella sativa* [Internet]. Disponible sur : <http://www.plantes.ca/fleurs/famille/nigella-sativa.html>
- [5] Medhi Hebidi. (2019) « Contribution à l'étude de la graine de nigelle ou cumin noir *Nigella sativa* L ». *Sciences pharmaceutiques*. dumas-02163603
- [6] Benhaddou Andaloussi, A. (2010). Étude des propriétés antidiabétiques de *Nigella sativa* : sites d'action cellulaires et moléculaires.
- [7] Ghedira, K. (2006). La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L.(Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 4(5), 220-226.
- [8] Bonnier, G. (1990). *La grande flore en couleur*. Édition Belin. Tomes 1-2-3-4, Paris, France, 1 401 p.
- [9] GUIGNARD, J.-L. (2001). *Botanique systématique moléculaire* (éd. 12e édition). Paris : Masson
- [10] ANTON, R., TEUSCHER, E., LOBSTEIN-GUTH, A., BAUERMANN, U., WERNER, M., ROHRNER, C., et al. (2005). *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Paris : Médicales internationales
- [11] Chamseddine, A., (2003). « ed. *La Curation par la Graine Noire* », *Dar al Kotob al Ilmiyah*: Beyrouth, Liban.
- [12] Schleicher, P., & Saleh, M. (2003). *Guérir au naturel avec le cumin noir d'Egypte*. Le Grand livre du mois.
- [13] Atta, M.B., (2003). "Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile". *Food Chem.*, 83: p. 63-68.
- [14] Al-Jasass, F.M. and M.S. Al-Jasser, (2012). Chemical composition and fatty acid content of some spices and herbs under Saudi Arabia conditions. *ScientificWorldJournal*,: p. 859892.

- [15] Ramadan, M.F., (2007) Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.) : an overview. *Int J Food Sci Tech*, 42: p. 1208-1218.
- [16] Singh, S., et al., (2014). Composition, in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *Biomed Res Int*, 2014: p. 918209.
- [17] Khoddami, A., et al., (2011). Physicochemical Characteristics of *Nigella* Seed (*Nigella sativa* L.) Oil as Affected by Different Extraction Methods. *J Am Oil Chem Soc*, 88: p. 533-540.
- [18] Hassanein, M. M. M., El-Shami, S. M., & El-Mallah, M. H. (2011). Investigation of lipids profiles of nigella, lupin and artichoke seed oils to be used as healthy oils. *Journal of Oleo science*, 60(3), 99-107.
- [19] Nickavar, B., et al., (2003). Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Z Naturforsch C*, 58(9-10): p. 629-31.
- [20] Cheikh-Rouhou, S., et al., (2006). *Nigella sativa* L. : Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction . *Food Chem*, (101): p. 673-681.
- [21] Tulukcu, E., (2011). A comparative study on fatty acid composition of black cumin obtained from different regions of Turkey, Iran and Syria. *Afr J Agr R*, 6(4): p. 892-895.
- [22] Ramadan, M.F. and J.T. Morsel, (2002). Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Nahrung*, 46(4): p. 240-4.
- [23] Ali, B.H. and G. Blunden, (2003). Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res*, 17(4): p. 299-305.
- [24] Ramadan, M.F. and J.-T. Mörse, (2002). Neutral lipid classes of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oils. *Eur Food Res Technol*, (214): p. 202-206.
- [25] Xue, W., et al., (2013). The investment in scent: time-resolved metabolic processes in developing volatile-producing *Nigella sativa* L. seeds. *PLoS One*, 8(9): p. e73061
- [26] Al-Gaby, A.M., (1998). Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* (black cumin) cake protein. *Nahrung*, 42(5): p. 290-4.
- [27] Oshchepkova Iu, I., et al., (2009). Isolation of the lipid-transporting protein Ns-LTP1 from seeds of the garden fennel flower (*Nigella sativa*). *Bioorg Khim*, 35(3): p. 344-9.
- [28] Al-Saleh, I., G. Billedo, and I.I. El-Doush, (2006). Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brants of *Nigella sativa* seeds. *J Food Compos Anal*, 19: p. 167-175.

- [29] El-Najjar, N., et al., (2011). Impact of protein binding on the analytical detectability and anticancer activity of thymoquinone. *J Chem Biol.*, 4(3): p. 97-107.
- [30] Lupidi, G., et al., (2010). Thymoquinone, a potential therapeutic agent of *Nigella sativa*, binds to site I of human serum albumin. *Phytomedicine*, 17(10): p. 714-20.
- [31] Al-Jenoobi, F.I., et al., (2010). Effect of black seed on dextromethorphan O- and N-demethylation in human liver microsomes and healthy human subjects. *Drug Metab Lett*, 4(1): p. 51-5.
- [32] Al-Jenoobi, F.I., et al., (2013). Effects of *Nigella sativa* and *Lepidium sativum* on cyclosporine pharmacokinetics. *Biomed Res Int*, 2013: p. 953520.
- [33] Abdelwahab, S.I., et al., (2013). Thymoquinone-loaded nanostructured lipid carriers: preparation, gastroprotection, in vitro toxicity, and pharmacokinetic properties after extravascular administration. *Int J Nanomedicine*, 8: p. 2163-72.
- [34] Le, P.M., et al., (2004). The petroleum ether extract of *Nigella sativa* exerts lipid-lowering and insulin-sensitizing actions in the rat. *J Ethnopharmacol.*, 94(2-3): p. 251-9.
- [35] Meddah, B., et al., (2009). *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *J Ethnopharmacol.*, 121(3): p. 419-24
- [36] Zaoui, A., et al., (2002). Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *J Ethnopharmacol.*, 79(1): p. 23-6.
- [37] Dollah, M.A., et al., (2013). Toxicity effect of *Nigella sativa* on the liver function of rats. *Adv Pharm Bull.*, 3(1): p. 97-102.
- [38] Badary, O.A., (1998). Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Dev Research*, 44(2-3): p. 56-61
- [39] Al-Ali, A., et al., (2008). Oral and intraperitoneal LD₅₀ of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 20(2): p. 25-7.
- [40] Al-Amri, A.M., (2009). Phase I safety and clinical activity study of thymoquinone in patients with advanced refractory malignant disease. *Shiraz E-Med.*, 10: p. 107-111.
- [41] Zedlitz, S., R. Kaufmann, and W.H. Boehncke, (2002). Allergic contact dermatitis from black cumin (*Nigella sativa*) oil-containing ointment. *Contact Dermatitis*, 46(3): p. 188
- [42] Steinmann, A., et al., (1997). Allergic contact dermatitis from black cumin (*Nigella sativa*) oil after topical use. *Contact Dermatitis*, 36(5): p. 268-9.

Chapitre III

**Les composés phénoliques,
méthodes d'extraction,
caractérisation et activité
biologique**

III.1. Introduction

Au tournant du XX^{ème} siècle, une ère de découvertes cruciales a marqué l'évolution des métabolites secondaires, ces composés analogues aux fonctions pharmacologiques prometteuses. Pour optimiser leur potentiel thérapeutique, des analyses approfondies des structures et des activités biologiques des dérivés prénylés de ces métabolites ont été engagées. Les métabolites secondaires englobent une catégorie de produits naturels aux propriétés multidimensionnelles, incluant des effets antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoires ainsi que des capacités anti-cancéreuses ou mutagènes [1].

Leur répartition au sein des végétaux est ubiquitaire, bien que leur présence et leur concentration diffèrent selon les fonctions qu'ils remplissent. Ces variations sont notables d'une espèce végétale à une autre. Parmi les familles prédominantes de métabolites secondaires figurent les polyphénols, lignines, stilbènes, flavonoïdes, phényl-propanoïdes, anthocyanes et tannins [2]. De manière remarquable, la synthèse du noyau aromatique se révèle être une prérogative exclusive des végétaux et micro-organismes. Les organismes animaux, pour la plupart, dépendent soit de leur alimentation, soit d'une symbiose pour élaborer les métabolites indispensables qui intègrent cette structure élémentaire, tels les acides aminés, vitamines, pigments, toxines, et autres constituants essentiels [3].

III.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, également appelés polyphénols, sont une classe de composés chimiques organiques présents dans le règne végétal. Ils se caractérisent par la présence d'un noyau benzénique (ou similaire) auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles (OH), communément appelés groupes phénoliques. Ces groupes hydroxyles peuvent être attachés à diverses fonctions chimiques, ce qui conduit à une grande variété de structures au sein de cette catégorie de composés. Les composés phénoliques sont largement répandus dans les plantes, où ils jouent un rôle essentiel dans la protection contre diverses agressions extérieures, notamment les rayons ultraviolets, les infections fongiques et les stress environnementaux [4].

Ces composés phénoliques ont suscité un intérêt considérable en raison de leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, et de leur implication dans

divers processus biologiques. Ils sont également responsables de la coloration distinctive de certains tissus végétaux, comme le bois, et contribuent aux arômes et aux saveurs caractéristiques de nombreux fruits, légumes et boissons [5].

Les composés phénoliques ont été largement étudiés pour leurs effets potentiels sur la santé humaine, en raison de leur présence dans l'alimentation et de leurs propriétés bioactives. Ils sont souvent considérés comme bénéfiques en raison de leur capacité à agir comme antioxydants, protégeant les cellules contre les dommages oxydatifs, mais leur impact sur la santé dépend de divers facteurs, notamment la quantité consommée et la spécificité du composé phénolique en question ; la figure III. 01 présente la structure chimique de différents composés phénoliques [6].

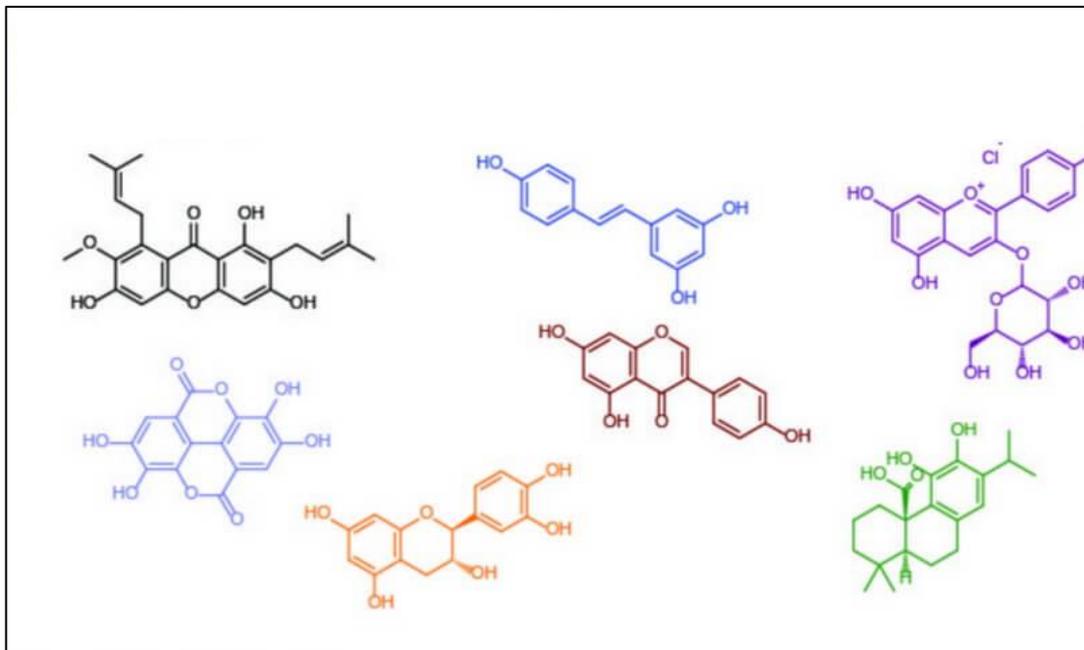


Figure III. 01 : Structure chimique de différents composés phénoliques [6]

III.3. Localisation des polyphénols

À l'échelle cellulaire, la synthèse initiale des polyphénols est assurée par les cellules du tissu de support (appelées cellules parenchymes) à l'endroit même où ils seront nécessaires, afin qu'ils puissent ensuite se diffuser dans la paroi cellulaire. Des études réalisées avec des techniques de micro spectrophotométrie ont révélé que les polyphénols peuvent être associés à la structure cellulaire ou exister sous forme libre au sein de la cellule. Ils se retrouvent

généralement dans les vacuoles (cavités) des cellules parenchymateuses, dans les rayons ligneux, ou encore au sein des fibres et des trachéides [7].

III.4. Propriétés chimiques des composés phénoliques

Une caractéristique cruciale des groupes hydroxyles présents dans les composés phénoliques est leur acidité, qui résulte de la propension des protons acides à être facilement libérés. Cette libération conduit à la formation d'anions phénoxyde, comme illustré dans la Figure ci-dessous, et ces anions sont stabilisés grâce à des phénomènes de résonance. Ces anions ont la capacité de perdre un électron pour former un radical [7], et cet électron libéré peut ensuite être capturé par un radical libre. La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi engendré lui confère une certaine stabilité, ce qui se traduit par une réactivité moindre, du fait de la délocalisation du radical [8].

Par la suite, il peut interagir avec d'autres radicaux libres. Les modifications les plus couramment observées sur les groupes phénoliques des composés végétaux comprennent principalement la méthylation et la conjugaison avec des esters et des glycosides, qui peuvent également être acylés. Dans leur état naturel, les polyphénols sont généralement glycosylés [9]. Par conséquent, la présence naturelle de certains polyphénols sous forme glycosidique dans les aliments affecte leur biodisponibilité. En effet, des études ont montré que la glycosylation, la conjugaison et la polymérisation tendent à réduire leur absorption intestinale [8,9].

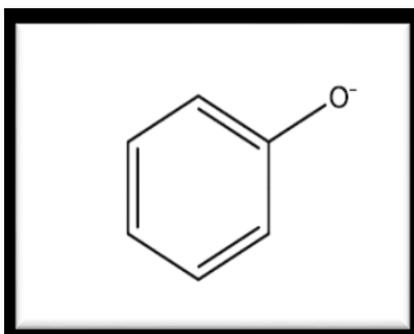


Figure III. 02 : Structure chimique de l'ion phénoxyde [8]

III.5. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques est le processus de séparation et de récupération de ces composés à partir de sources naturelles, telles que des plantes, des fruits, des légumes ou d'autres matières végétales, en utilisant des solvants ou des méthodes spécifiques. Cette procédure vise à isoler les composés phénoliques, tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tannins, etc., de manière à les rendre disponibles pour des applications diverses, notamment en alimentation, en médecine, en recherche scientifique ou dans l'industrie. L'extraction des composés phénoliques peut être réalisée en utilisant diverses techniques, notamment l'extraction par solvant, l'extraction par ultrasons, l'extraction par fluide supercritique ou d'autres méthodes adaptées aux propriétés chimiques des composés ciblés et aux objectifs de l'extraction [10].

On peut classer les méthodes d'extraction en deux familles : les techniques traditionnelles (conventionnelle) et les techniques innovantes (non conventionnelle) qui permettent l'intensification de l'extraction. Le but d'intensifier l'extraction à l'aide de prétraitements électriques et / ou mécaniques est d'obtenir un fort rendement d'extraction tout en réduisant les énergies mises en jeu [11].

III.5.1. Procédés traditionnels d'extraction – Extraction conventionnelle

III.5.1.1 Définition

L'extraction par solvant est un processus qui implique l'immersion de matière végétale dans un solvant pour extraire et dissoudre les composés d'intérêt. Le résultat de cette procédure peut se présenter sous deux formes : sous forme liquide, où le solvant contient en solution les composés d'intérêt, ou sous forme solide, où ces composés sont obtenus sous forme de poudre après évaporation du solvant. Plusieurs méthodes d'extraction, communément désignées comme des 'procédés traditionnels', sont couramment utilisées pour ce faire [12]. Parmi ces méthodes, on peut citer :

- La macération (par exemple, la préparation de cornichons dans du vinaigre) : cette méthode consiste à mettre le solide en contact avec le solvant d'extraction à température ambiante, avec l'extraction se produisant par simple diffusion.
- L'infusion (par exemple, la préparation d'une infusion de thé) : cette technique implique de placer le solide dans un solvant préalablement chauffé jusqu'à sa température d'ébullition.

- La percolation (comme dans une cafetière) : cette méthode suppose le passage du solvant d'extraction à travers le solide, s'écoulant de haut en bas.
- La décoction (comme dans la préparation d'un café turc) : ce procédé nécessite l'ébullition simultanée du solvant et du solide pendant une durée d'extraction définie [13].

III.5.1.2. Mécanisme

L'extraction solide-liquide suit les principes des lois de transfert et d'échange de matière, et ce processus peut être décomposé en plusieurs étapes distinctes au cours desquelles les solutés sont transférés de la matrice solide vers le solvant :

- **Passage du solvant du milieu environnant vers la surface externe du solide** : Au début de l'extraction, le solvant pénètre depuis l'extérieur vers la surface du solide, amorçant le processus d'extraction.
- **Diffusion du solvant dans la structure du solide** : Une fois le solvant à la surface du solide, il commence à se diffuser à l'intérieur de la structure solide, pénétrant les pores et les canaux.
- **Passage du soluté dans le solvant par dissolution** : Les molécules d'intérêt, ou solutés, se dissolvent dans le solvant au fur et à mesure que ce dernier les atteint. Cette étape est cruciale pour l'extraction des composés d'intérêt.
- **Transfert de la solution contenant le soluté vers la surface du solide par diffusion** : La solution ainsi formée, contenant les solutés dissous, se diffuse du cœur du solide vers sa surface, où elle est prête à être récupérée.
- **Transfert par convection naturelle ou forcée de la surface du solide vers la solution environnante extérieure** : Enfin, la solution extraite, portant les solutés, est transférée de la surface du solide vers la solution environnante, que ce soit par un mouvement naturel du liquide ou par une agitation forcée [13,14].

Le temps nécessaire pour accomplir cette opération d'extraction est déterminé par la vitesse à laquelle les solutés sont extraits, c'est-à-dire la vitesse globale de transfert. Cette vitesse est influencée par trois processus fondamentaux d'échange de matière :

- **La solubilisation des molécules d'intérêt** : Cette étape dépend des caractéristiques de l'échantillon solide et de la surface d'échange disponible entre le solvant et le solide. Plus la surface est grande, plus le processus de solubilisation est efficace.
- **La diffusion ou le flux de matière déplacée** : La quantité de solvant et de solutés transférée dépend du gradient local de concentration à l'interface solide-liquide. Un gradient plus important accélère le processus de diffusion.
- **L'homogénéisation du solvant lors de l'extraction par agitation** : L'agitation du solvant peut réduire l'épaisseur de la couche limite autour du solide. Cela peut également prévenir la formation d'une couche de solvant saturé en favorisant un mouvement de fluide frais et moins chargé à cet endroit, ce qui accélère l'extraction [15].

III.5.2. Procédés innovants d'extraction – Extraction non conventionnelle

L'extraction des polyphénols à l'aide des méthodes conventionnelles est souvent une étape longue et exigeante en termes de consommation de solvants et d'énergie. Afin d'atténuer ces limitations, de nouvelles méthodes d'intensification ont été développées pour compléter les techniques traditionnelles. Ces approches incluent l'utilisation d'ultrasons, de micro-ondes, de l'extraction par fluide supercritique, de hautes pressions, de l'extrusion, de la détente instantanée contrôlée (DIC), de champs électriques pulsés, et de décharges électriques à haute tension. Ces techniques d'intensification agissent selon divers mécanismes pour perturber les membranes et/ou les parois cellulaires, facilitant ainsi l'extraction des composés phénoliques dans le milieu environnant [16].

III.5.2.1 Les ultrasons

Les ultrasons sont une technologie largement déployée à l'échelle industrielle et trouvent leur utilisation dans une variété de domaines, notamment le traitement des polluants de l'eau, le séchage, le dégazage, l'élimination de la mousse, le découpage, la production d'émulsions, l'inactivation de spores, d'enzymes et de microorganismes, entre autres. Ils consistent en des ondes ultrasonores capables de générer des vibrations mécaniques dans les solides, les liquides ou les gaz (figure III. 03). Ces ultrasons sont classés en deux catégories distinctes en fonction de la gamme de fréquences utilisée. En effet, lorsque la fréquence des ultrasons est élevée (2 à 10 MHz) et que la puissance est relativement basse, on parle d'ultrasons de diagnostic. En revanche, les ultrasons de puissance sont caractérisés par une fréquence plus basse (20 à 500 kHz) et une puissance plus élevée. Ces deux catégories d'ultrasons se distinguent par leurs applications. Les ultrasons de diagnostic sont généralement

employés dans le domaine médical, tandis que les ultrasons de puissance sont principalement utilisés dans le contexte de l'extraction [17-19].

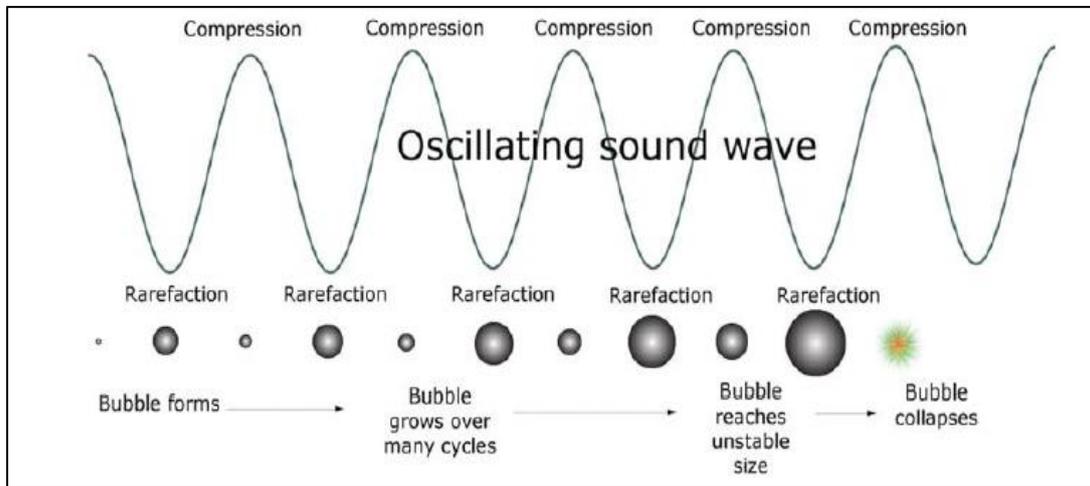


Figure III. 03. : Cycles de compression et de raréfaction induits par les ondes sonores [16]

III.5.2.2. Mécanisme d'action

Lorsque les ultrasons sont utilisés dans un milieu solide-liquide, ils engendrent deux phases distinctes : un cycle de compression à haute pression, suivi d'un cycle de dépression à basse pression. Pendant le cycle de dépression, ces ondes créent de minuscules bulles de vapeur, que l'on appelle couramment 'bulles de cavitation' [17]. Au cours du cycle de compression, ces bulles de cavitation implosent lorsqu'elles ne peuvent plus absorber d'énergie, un phénomène désigné sous le nom de 'cavitation ultrasonore'. La cavitation ultrasonore génère des conditions locales de température et de pression extrêmement élevées, atteignant jusqu'à 50 MPa et 5000°C [19]. En parallèle, elle provoque la formation de micro-jets de liquide qui endommagent les membranes cellulaires à proximité, créant ainsi une agitation au niveau de la couche limite. Ces effets physiques de la cavitation améliorent le processus d'extraction des composés d'intérêt en facilitant l'accès du solvant à l'intérieur de la matrice solide (figure III.04) [18,19].

Il est essentiel d'ajuster de manière précise les paramètres qui influencent l'action des ultrasons pour maximiser l'efficacité de cette méthode d'extraction et d'intensification.

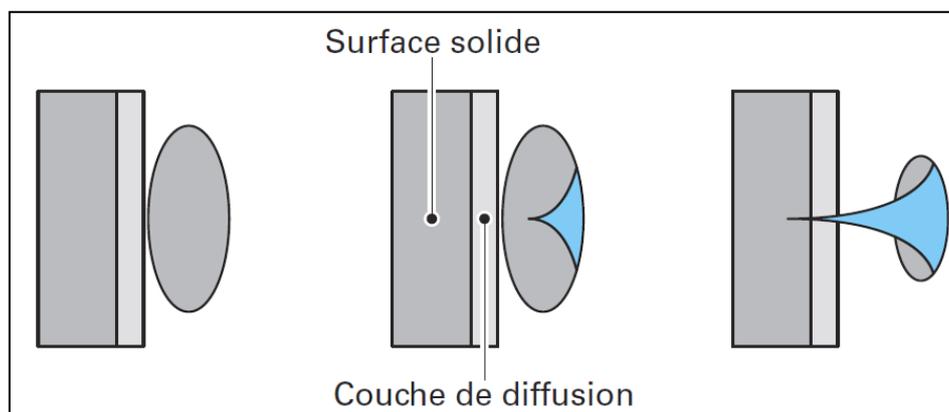


Figure III. 04 : Implosion d'une bulle de cavitation et formation de micro-jets à la surface du solide [16]

III.5.2.3. Effet des paramètres opératoires

Plusieurs facteurs influencent l'efficacité des ultrasons lors de l'extraction. Parmi eux, on trouve des paramètres liés à l'extraction en général, tels que la composition du solvant, le rapport liquide/solide, la taille des particules, et d'autres spécifiques aux ultrasons, notamment la fréquence, la température de l'extraction par ultrasons, la puissance, entre autres. L'analyse de l'impact de ces paramètres sur le processus d'extraction est essentielle pour optimiser et maximiser les quantités extraites [16].

- **La Fréquence :** La fréquence des ultrasons joue un rôle majeur dans l'efficacité de l'extraction de manière indirecte. En effet, à des fréquences élevées, de l'ordre du MHz, la formation de bulles de cavitation devient plus difficile par rapport aux basses fréquences, de l'ordre du kHz. Cela est dû aux cycles de compression et de dépression des ondes sonores. À des fréquences élevées, ces cycles sont si courts que les molécules du liquide ne peuvent pas se séparer pour former une bulle de vide, entraînant ainsi l'absence de cavitation [20].
- **Le Solvant :** Le choix du solvant est généralement basé sur l'affinité moléculaire avec le soluté, mais la nature et les propriétés physiques du solvant affectent le phénomène de cavitation. Habituellement, l'extraction est réalisée dans l'eau, mais il existe des cas documentés d'extraction avec des solvants organiques tels que l'éthanol. En général, la présence et l'intensité de la cavitation diminuent lorsque la pression de vapeur et la viscosité du solvant augmentent [20,21]. Les liquides visqueux exigent des variations de pression acoustique plus importantes pour atteindre le seuil de cavitation, en raison de leur

viscosité accrue, ce qui dissipe l'énergie dans les forces de cohésion du liquide. En ce qui concerne la pression de vapeur du liquide, elle affecte la dynamique des bulles, avec une facilité d'entrée en cavitation pour les liquides à pression de vapeur élevée, tandis que l'énergie dissipée lors de l'effondrement est moindre, conduisant ainsi à une intensité de cavitation plus élevée avec des liquides à faible pression de vapeur. Il est donc essentiel de choisir soigneusement le solvant en prenant en compte ces facteurs de diffusion et de cavitation [21].

- **La Température :** La température est un paramètre qui influe sur l'extraction assistée par ultrasons à différents niveaux. L'augmentation de la température améliore la solubilité des molécules et leurs coefficients de diffusion. La température affecte également la viscosité et la pression de vapeur du milieu [22]. Cependant, une température plus basse favorise les réactions sonochimiques, car la cavitation est plus intense à des températures plus basses. Il est donc nécessaire de maintenir la température à son niveau optimal pour favoriser à la fois la diffusion et la cavitation. Pour ce faire, on peut réaliser l'extraction dans un récipient placé dans un bain de glace ou de glycol pour maintenir une température basse et constante [23].
- **La Puissance :** Selon de nombreuses études scientifiques, l'augmentation de la puissance est un paramètre clé pour améliorer l'efficacité du processus d'extraction, car elle facilite la destruction des cellules par les micro-jets produits lors de l'implosion des bulles de cavitation près de la surface du solide. Cela augmente la perméabilité du tissu et l'extraction des composés bioactifs. De plus, la puissance élevée améliore la pénétration du solvant dans la cellule, la solubilité des composés grâce aux températures et aux pressions élevées dans la zone de cavitation, ainsi que le processus de diffusion en agitant la couche superficielle de solvant en continu, permettant au solvant frais ou moins chargé de saisir les composés nouvellement extraits. En résumé, la puissance des ultrasons améliore le transfert de matière de multiples façons interconnectées [24].

III.5.2.3. Equipements de traitement

Les équipements pour le traitement et l'extraction par ultrasons varient en fonction de l'échelle de travail, que ce soit en laboratoire ou en environnement industriel. À petite échelle, deux types de dispositifs sont couramment utilisés : les bains à ultrasons et les sondes à ultrasons. Les bains à ultrasons sont généralement employés pour des applications de désinfection. Ils fonctionnent à des fréquences comprises entre 25 et 50 kHz, avec des

puissances acoustiques de 1 à 5 W/cm². Ces appareils immergent les objets ou les échantillons dans un liquide et utilisent les ultrasons pour éliminer les contaminants.

En revanche, les sondes à ultrasons sont employées dans le domaine de l'extraction. La configuration de la sonde permet la propagation axiale des ondes sonores, avec des dissipations radiales dans la suspension, qui peut contenir à la fois des solides et des liquides. Ces sondes sont spécialement conçues pour favoriser le phénomène de cavitation et l'extraction des composés souhaités, comme il est illustré dans la figure III. 05 [25].

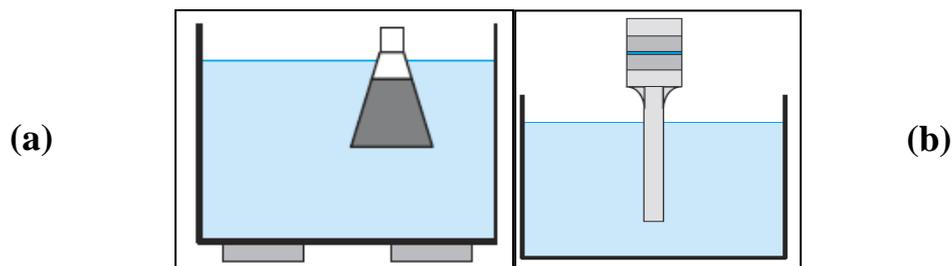


Figure III. 05 : Bain à ultrasons (a) et sonde à ultrasons (b) [26]

À l'échelle industrielle, notamment dans les domaines pharmaceutique, cosmétique, et autres, divers dispositifs sont utilisés pour le traitement et l'extraction par ultrasons. Parmi eux, on trouve les systèmes suivants :

- **Réacteur sous agitation avec sonde ultrasonore immergée :** Ce système consiste en un réacteur équipé d'un agitateur dans lequel une sonde ultrasonore est immergée. La sonde émet des ultrasons directement dans la solution ou la suspension à l'intérieur du réacteur. Cette configuration permet un traitement et une extraction efficaces des composés souhaités.
- **Réacteur sous agitation avec émetteurs d'ultrasons au niveau de la paroi ou à la base :** Dans ce cas, le réacteur est également doté d'un agitateur, mais au lieu d'une sonde ultrasonore immergée, des émetteurs d'ultrasons sont placés soit le long de la paroi du réacteur, soit à sa base. Ces émetteurs diffusent les ultrasons dans le contenu du réacteur de manière à provoquer la cavitation et l'extraction des composés.
- **Réacteur ultrasonore avec double enveloppe :** Ce type de réacteur est spécialement conçu pour l'utilisation d'ultrasons. Il comporte une double enveloppe, ce qui signifie qu'il est constitué de deux parois concentriques. L'espace entre ces parois est rempli d'un liquide qui permet de refroidir ou de chauffer le contenu du réacteur tout en diffusant les ultrasons. Cette configuration offre un contrôle précis de la température tout en profitant

des avantages de l'ultrason pour l'extraction et le traitement des produits chimiques (figure III.06).

Chacun de ces dispositifs est adapté à des besoins spécifiques dans l'industrie, permettant ainsi une utilisation efficace des ultrasons pour diverses applications de traitement, d'extraction et de réaction chimique [26].

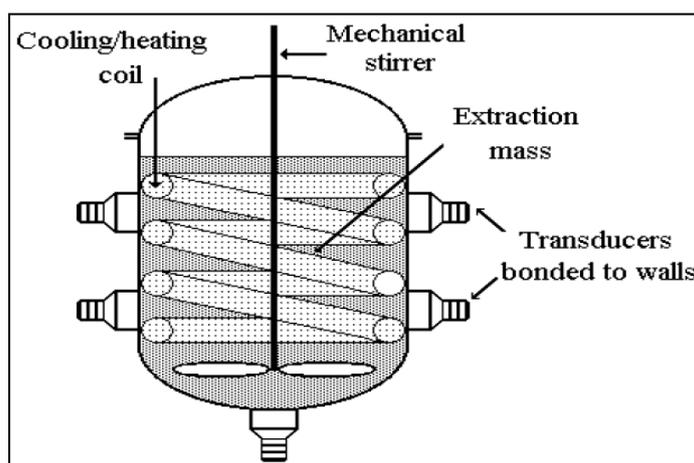


Figure III. 06 : Réacteur pour extraction par ultrasons des tissus de plantes [26]

III.6. Méthodes de caractérisations des polyphénols

III.6.1. Etude par spectrophotométrie (UV-visible)

La spectroscopie d'absorption dans l'UV (ultraviolet) et le visible est une méthode couramment utilisée en laboratoire pour l'analyse de substances. Elle repose sur la capacité des molécules à absorber la lumière à des longueurs d'onde spécifiques. Le domaine UV-visible s'étend approximativement de 10 à 800 nanomètres (nm), avec une subdivision en UV lointain (10-200 nm), proche UV (200-400 nm) et visible (400-800 nm). La spectroscopie UV-visible trouve une large gamme d'applications dans divers domaines tels que la chimie minérale, la chimie organique, la biochimie, les analyses médicales et les analyses quantitatives. Cette utilisation généralisée découle principalement de ses avantages, notamment une grande sensibilité (pouvant détecter des concentrations aussi faibles que 10^{-5} M), une précision (avec une marge d'erreur de 1 à 5%), une rapidité d'analyse et une facilité d'utilisation.

En somme, la spectroscopie UV-visible est un outil polyvalent et fiable pour l'analyse quantitative et qualitative des substances, offrant aux chercheurs et aux scientifiques un

moyen efficace d'obtenir des informations précieuses sur la composition et les propriétés des échantillons analysés [27].

III.6.2. Principe

La spectrophotométrie se concentre principalement sur la mesure de l'absorbance dans le domaine UV/Visible. Cette absorption est le résultat du déplacement d'un électron d'un niveau énergétique à un niveau énergétique supérieur, accompagné de changements dans les états de vibration et de rotation. En d'autres termes, un électron passe d'une orbite moléculaire à une autre. Le processus de spectrophotométrie se déroule généralement de la manière suivante : une solution que l'on souhaite analyser est placée dans une cuve en quartz, caractérisée par des faces transparentes et parallèles. Cette cuve est traversée par un faisceau optique qui frappe perpendiculairement ces faces. Après avoir sélectionné une longueur d'onde spécifique, la lumière monochromatique incidente, initialement d'intensité I_0 , passe à travers la cuve contenant la solution. L'appareil mesure ensuite l'intensité I de la lumière qui est transmise à travers la solution. La valeur affichée par l'appareil est l'absorbance à cette longueur d'onde [28].

En résumé, la spectrophotométrie UV/Visible est une technique permettant de mesurer l'absorption de la lumière par une solution, ce qui fournit des informations précieuses sur la composition de la solution, notamment en étudiant la transition d'électrons entre les niveaux énergétiques des molécules. Cette méthode est largement utilisée en chimie, en biochimie et dans d'autres domaines pour l'analyse quantitative et qualitative des substances [29].

III.6.3. Appareillage

Les spectrophotomètres UV-visible utilisent généralement deux types de lampes pour couvrir l'ensemble du spectre UV-visible. Les lampes au deutérium émettent un rayonnement dans la plage de longueurs d'onde de 180 à 400 nm, couvrant la partie UV du spectre. En revanche, les lampes halogène au quartz à filaments de tungstène sont utilisées pour la partie visible du spectre, émettant des longueurs d'onde de 350 à 1300 nm. La présence de l'halogène dans ces lampes prolonge considérablement leur durée de vie (entre 1500 et 2000 heures). Les spectrophotomètres sont équipés de monochromateurs, qui servent à sélectionner une longueur d'onde spécifique parmi le spectre de raies de lumière incidente. Habituellement, le monochromateur est positionné entre l'échantillon et la source lumineuse, protégeant ainsi les échantillons contre le rayonnement. Cependant, ce dispositif optique complexe peut

ralentir le système de balayage. Les monochromateurs sont caractérisés par leur large plage spectrale et leur haute résolution. Les spectrophotomètres équipés de monochromateurs utilisent des détecteurs monocanaux pour collecter les données.

En revanche, les polychromateurs sont utilisés dans les spectrophotomètres à détecteurs multiples. Le polychromateur est positionné derrière l'échantillon, ce qui permet à l'échantillon de recevoir tout le rayonnement UV-visible. Contrairement aux monochromateurs, les polychromateurs ne comportent pas de pièces mobiles, ce qui garantit une grande reproductibilité des mesures. Cependant, ils ont une plage spectrale plus limitée et une résolution moindre. Dans ce cas, les spectrophotomètres utilisent des détecteurs multicanaux, et le signal est collecté via un microprocesseur à la sortie de chacun des détecteurs [30].

III.6.2. Etude par chromatographie

La chromatographie est une méthode de séparation des composants d'un mélange en se basant sur des différences d'affinité entre les substances à analyser et deux phases distinctes, dont une phase stationnaire (ou fixe) et une phase mobile [31].

III.6.2.1. Principe

La chromatographie est un procédé qui vise à séparer les différentes molécules présentes dans un mélange en fonction de leur vitesse de migration. Ce processus repose sur l'interaction des molécules avec deux phases distinctes : une phase stationnaire et une phase mobile.

La phase stationnaire est un support fixe sur lequel les molécules du mélange se fixent temporairement, c'est-à-dire qu'elles sont adsorbées. La phase mobile, quant à elle, est un liquide (dans le cas de la chromatographie liquide) ou un gaz (dans la chromatographie en phase gazeuse) qui transporte les molécules à travers la phase stationnaire. Lorsque le mélange est introduit dans le système de chromatographie, les molécules interagissent différemment avec la phase stationnaire en fonction de leurs caractéristiques chimiques. Certaines molécules adhèrent plus fortement à la phase stationnaire que d'autres. Cela crée une distribution inégale des composants du mélange entre les deux phases.

Ensuite, l'éluant, qui est un solvant ou un gaz, est introduit pour désorber les molécules de la phase stationnaire. Les molécules se détachent de la phase stationnaire et se déplacent

avec l'éluant. En raison de leurs différences d'interaction avec la phase stationnaire, les molécules se déplacent à des vitesses différentes dans la phase mobile. Cette différence de vitesse entraîne la séparation des constituants du mélange. Au fur et à mesure que les molécules se déplacent à travers le système chromatographique, elles sont détectées et enregistrées, ce qui permet de les identifier et de quantifier. Les différents constituants du mélange sont ainsi récupérés séparément dans plusieurs fractions, ce qui permet une analyse précise de leur composition. La chromatographie est une technique puissante et polyvalente largement utilisée en chimie analytique, en biochimie, et dans de nombreux autres domaines scientifiques [32].

III.6.2.2. La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique qui exploite les interactions des solutés avec deux phases, l'une mobile et l'autre stationnaire, sous haute pression. Les solutés sont séparés en fonction de divers paramètres tels que leur affinité pour l'éluant, leur polarité ou leur charge électrique. Une fois séparés, les solutés sont identifiés et quantifiés à l'aide d'un détecteur couplé à la colonne chromatographique [32].

Le fonctionnement de la HPLC est le suivant : à un moment donné, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne chromatographique et est transporté par la phase mobile. Les différents constituants du mélange sont recueillis et identifiés en fonction de leur vitesse d'adsorption (liaison à la phase stationnaire) et de leur vitesse de désorption (libération de la phase stationnaire). Le résultat de la chromatographie est un tracé caractéristique des constituants (appelé pic) en fonction de leur temps de rétention à la sortie de la colonne chromatographique, ce qui crée un chromatogramme. Ce chromatogramme offre une représentation visuelle des différentes molécules présentes dans le mélange, ce qui permet une identification précise des composants et une quantification de leurs concentrations [32].

III.6.2.3 La chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC-MS)

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode permettant de diviser les molécules d'un mélange. Cette technique est adaptée aux composés qui peuvent être vaporisés sans subir de décomposition. Le mélange des solutés à analyser est converti en une phase gazeuse à l'intérieur d'une colonne grâce à un injecteur chauffé à une température adaptée à la volatilité de l'échantillon. Ensuite, ce mélange est déplacé au sein de la colonne par un gaz

vecteur. À l'intérieur de cette colonne se trouve une substance active appelée phase stationnaire, qui peut être soit liquide soit solide. Le gaz vecteur est chimiquement inerte vis-à-vis des solutés et de la phase stationnaire. Les différentes molécules se séparent en fonction de leur vitesse d'adhérence à la phase stationnaire et de leur vitesse de libération, sortant ainsi de la colonne les unes après les autres. Le temps de rétention de chaque molécule dépend de son degré d'interaction avec la phase stationnaire. En fin de parcours, un détecteur, tel qu'un spectromètre de masse dans ce contexte, identifie et mesure les caractéristiques de chaque constituant du mélange [33].

III.7. Activité biologique des composés phénoliques

III.7.1. Activité antioxydante

L'oxygène produit au niveau des mitochondries génère des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui peuvent être toxiques pour l'ensemble de la cellule. Dans ce contexte, les polyphénols exercent leur activité antioxydante en piégeant directement les ERO, que ce soit en phase aqueuse ou en phase organique. De plus, ces polyphénols peuvent agir de deux autres manières : premièrement, en inhibant les enzymes pro-oxydantes et en chélatant les ions métalliques, et deuxièmement, en protégeant les systèmes biologiques de défense antioxydante. L'efficacité antioxydante des polyphénols dépend de leur structure, notamment de la position des groupes hydroxyles sur les noyaux aromatiques et de la capacité des composés aromatiques à soutenir la délocalisation des électrons [34].

Les polyphénols sont réputés pour leur capacité à protéger la peau contre les effets nocifs du stress photo-oxydant provoqué par l'exposition aux rayons solaires. C'est pourquoi on les trouve fréquemment parmi les ingrédients de nombreuses préparations cosmétiques destinées à traiter le vieillissement cellulaire et à protéger la peau contre les dommages causés par le soleil [35,36].

III.7.1. Activité antimicrobienne

Des recherches récentes ont révélé que les polyphénols démontrent une activité antibactérienne significative [37].

Les polyphénols présentent une activité antibactérienne grâce à deux mécanismes d'action distincts :

- **Inhibition de la synthèse d'acide nucléique** : Les polyphénols interfèrent avec le processus de synthèse de l'acide nucléique (ADN et ARN) au sein des bactéries. Ils peuvent perturber la réplication de l'ADN bactérien, entravant ainsi la croissance et la multiplication des bactéries. En agissant sur l'acide nucléique, les polyphénols altèrent la capacité des bactéries à se reproduire et à survivre [38].
- **Endommagement des membranes cellulaires** : Les polyphénols peuvent également provoquer des dommages au niveau des membranes cellulaires des bactéries. Ils perturbent la structure de ces membranes, ce qui entraîne une fuite de composants essentiels, comme les ions et les protéines, à l'extérieur de la cellule bactérienne. Cette altération de la membrane cellulaire peut causer une perte de l'intégrité cellulaire et, finalement, la mort de la bactérie.

En combinant ces deux mécanismes, les polyphénols exercent une action antibactérienne efficace. Ils sont capables de cibler plusieurs aspects vitaux de la bactérie, ce qui réduit sa capacité à survivre et à se propager. Cette découverte renforce l'intérêt des polyphénols dans le développement de nouvelles stratégies de lutte contre les infections bactériennes [39].

III.8. Conclusions

Les composés phénoliques représentent un groupe de composés naturels aux propriétés remarquables. Leur extraction, caractérisation et activité biologique ont suscité un vif intérêt dans le domaine de la recherche scientifique. Ces composés sont extraits à partir d'une variété de sources, notamment des plantes, des fruits, des légumes, et même des déchets industriels. Leur caractérisation implique des techniques analytiques avancées permettant de déterminer leur structure et leur concentration.

L'activité biologique des composés phénoliques est diverse et impacte positivement la santé humaine. Leurs propriétés antioxydantes en font des agents de choix pour la protection contre le stress oxydatif et le vieillissement cellulaire. De plus, leur action antibactérienne contribue à la lutte contre les infections bactériennes, et leur potentiel anticancéreux est l'objet de nombreuses recherches. Les composés phénoliques continuent d'être étudiés et exploités pour leurs bienfaits potentiels pour la santé. Leur rôle dans la prévention des maladies, la cosmétique, l'alimentation et d'autres domaines est prometteur, et la recherche se poursuit pour mieux comprendre leurs mécanismes d'action et leur potentiel thérapeutique.

Références bibliographiques

- [1] Das, A. B., Goud, V. V., & Das, C. (2018). Extraction and Characterization of Phenolic Content from Purple and Black Rice (*Oryza Sativa* L) Bran and Its Antioxidant Activity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 332-345.
- [2] Karak, P. (2019). Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 1567-1574.
- [3] Oboh, G., Nwanna, E. E., Oyeleye, S. I., Olasehinde, T. A., Ogunsuyi, O. B., & Boligon, A. A. (2016). In Vitro Neuroprotective Potentials of Aqueous and Methanol Extracts from *Heinsia Crinita* Leaves. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), 95-102
- [4] Cheaib, D., El Darra, N., Rajha, H. N., Maroun, R. G., & Louka, N. (2018). Systematic And Empirical Study of The Dependence of Polyphenol Recovery from Apricot Pomace on Temperature and Solvent Concentration Levels. *The Scientific World Journal*, 2018.
- [5] Muanda, F. N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, p 60.
- [6] KERBOUCHE, L. (2010). Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de quelques plantes des familles de labiacées et de cupressacées (Doctoral dissertation, INA).
- [7] Martin S. et Andriantsitohaina R., (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51 ; pp :304-315.
- [8] Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B. (2013). The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia Officinalis* L.) Extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 84-91.
- [9] Wen, L., Lin, L., You, L., Yang, B., Jiang, G., & Zhao, M. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction and Structural Identification of Polysaccharides from *Isodon Lophanthoides* Var. *Gerardianus* (Bentham) H. Hara. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 541-547.
- [10] Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Núñez, M.J., (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chem.* 85, 267–273.

- [11] Mota, I., Rodrigues Pinto, P.C., Novo, C., Sousa, G., Guerreiro, O., Guerra, A.R., Duarte, M.F., Rodrigues, A.E., (2012). Extraction of polyphenolic compounds from *Eucalyptus globulus* bark: Process optimization and screening for biological activity. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 6991–7000.
- [12] Frémeaux, P., Leybros, J., (1990). Extraction solide-liquide. Aspects théoriques. *Tech. L'ingénieur J 2 780*.
- [13] El-Belghiti, K., (2005). Amélioration de l'extraction aqueuse de solutes des produits végétaux par champs électriques pulsés. Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France.
- [14] Goldstein, D.B., Chin, J.H., (1981). Interaction of ethanol with biological membranes. *Fed. Proc.* 40, 2073–2076.
- [15] Dedrie, M., Jacquet, N., Bombeck, P.-L., Hébert, J., Richel, A., (2015). Oak barks as raw materials for the extraction of polyphenols for the chemical and pharmaceutical sectors: A regional case study. *Ind. Crops Prod.* 70, 316–321.
- [16] BOURAS, M. (2015) Etude comparative et optimisation de prétraitements des écorces de bois pour l'extraction des composés phénoliques. Thèse de doctorat. Compiègne.
- [17] Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H., (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4988–4994
- [18] Chemat, S., Lagha, A., AitAmar, H., Bartels, P. V, Chemat, F., (2004). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour Fragr. J.* 19, 188–195.
- [19] Aspé, E., Fernández, K., (2011). The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. *Ind. Crops Prod.* 34, 838–844.
- [20] Santos, H.M., Lodeiro, C., Capelo-Martínez, J.-L., (2009). The Power of Ultrasound, *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*
- [21] Boussetta, N., Soichi, E., Lanoisellé, J.-L., Vorobiev, E., (2014). Valorization of oilseed residues: Extraction of polyphenols from flaxseed hulls by pulsed electric fields. *Ind. Crops Prod.* 52, 347–353.
- [22] Mason, T.J., (1997). Ultrasound in synthetic organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 26, 443–451.

- [23] Dash, K., Thangavel, S., Krishnamurthy, N. V., Rao, S. V., Karunasagar, D., Arunachalam, J., (2005). Ultrasound-assisted analyte extraction for the determination of sulfate and elemental sulfur in zinc sulfide by different liquid chromatography techniques. *Analyst* 130, 498–501.
- [24] Prakash Maran, J., Manikandan, S., Vigna Nivetha, C., Dinesh, R., (2013). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arab. J. Chem.*
- [25] Poux, M., Cagnet, P., Gourdon, C., (2010). Génie des procédés durables - Du concept à la concrétisation industrielle : Du concept à la concrétisation industrielle, Environnement et sécurité. Dunod.
- [26] Vinatoru, M., (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* 8, 303–313.
- [27] Guedira, F. (2009). Support de cours de spectroscopie ultraviolette. Université Mohammed V-Agdal, Maroc, 3. l'université Mohammed V-Agdal, Maroc, pp 1-34.
- [28] Galez, P., (2011). Mesures Physiques Annecy : Techniques spectroscopiques d'analyse / Spectrophotométrie UV/visible, pp 1-17.
- [29] Ludovic, J., (2006). De la substance à la structure : Exemples en chimie organique, pp 16-17.
- [30] Clark, B.J., Frost, T., Russell, M.A. (1993). UV spectroscopy techniques, instrumentation, data handling. *Techniques in visible and ultraviolet spectrometry*, 4, Chapman and Hall, London, UK, pp 1- 143.
- [31] Lavallaz, P., Délétroz, R., (1994). Chromatographie, <http://www.etudiants.ch/upload/documents/superuser/chromatographie.pdf>. Pp 1-14
- [32] Panaiva, L. (2006). Techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites. In Conférence Eurocopter Marseille, France (Vol. 3).
- [33] Bouchonnet, S., Libong D., (2004). Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *Actual. Chim.*, 275, pp 7-14.
- [34] Halliwell, B., (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, 52 (8), pp253-265.
- [35] Fuchs, J., (1998). Potentials and limitations of the natural anti-oxidants RRR- α -tocophérol, L- ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. *Free Rad. Biol. Med.*, 25, pp 848-873.

- [36] Mena, F., Menna, A., Tréton, J., (2014). Polyphenols against skin aging in polyphenols in human health and disease. 1, pp 819-830.
- [37] Ferrazzano, G.F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli A., Pinto, G., Pollio, A., (2011). Plant polyphenols and their anti-carcinogenic properties: a review. *Molecules*, 16, pp 1486-507.
- [38] Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., Xu, X., (2013). Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase, *J. Agric. Food Chem.*, 6, pp 8185-8190.
- [39] Tsuchiya, H., Linuma, M., (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*, *Phytomedicine*, 7, pp 161-165.

Partie II :

Etude Expérimentale

Chapitre I

**Matériels
&
Méthodes**

I.1. Introduction

Notre recherche s'est déroulée au sein de deux institutions de renom, le laboratoire de recherche de bioconversion génie microbiologique et sécurité sanitaire (LBGMSS) de l'Université de Mascara Mustapha Stambouli en Algérie, ainsi que le laboratoire de chimie organique de la faculté des sciences et de la technologie de l'Université Castilla-la Mancha (UCLM) en Espagne. Notre étude s'est principalement concentrée sur l'optimisation des conditions ultrasoniques pour l'extraction des composés phénoliques issus des graines de nigelle, plus précisément *Nigella sativa. L.* Ce travail impliquait également une analyse approfondie des caractéristiques physico-chimiques des extraits obtenus, ainsi que l'évaluation de leur activité biologique. Au cours de cette recherche, nous avons exploré de nombreuses facettes de ces précieux composés phénoliques, mettant en lumière leur potentiel et leur pertinence dans divers domaines.

I.2. Matériel utilisé

I.2.1. Matériel végétal

Les spécimens végétaux employés dans cette recherche sont issus des graines de la nigelle (*Nigella sativa. L.*). Ces graines ont été collectées en mars 2022 dans la forêt "Chouachi," située dans la commune de Sidi Ali, à environ 60 kilomètres du chef-lieu de la wilaya de Mostaganem (figures I.01 et I.02). L'identification de ces graines a été réalisée par un botaniste de l'université de Mascara Mustapha Stambouli.



Figure I. 01 : Carte géographique montrant la zone de collecte [1]



Figure I. 02 : la forêt « Chouachi » et les graines de *Nigella sativa* [2]

I.2.2. Broyage du matériel végétal

Les graines ont été réduites en poudre fine à l'aide d'un broyeur Pulverisette 14 (FRITSCH, Idar-Oberstein, Allemagne) (Annexe I) et par la suite, la poudre obtenue a été dégraissée à température ambiante à l'aide d'hexane. Cette poudre a ensuite été soigneusement conservée dans un récipient en verre ambré, correctement séchée, et hermétiquement scellée pour la protéger de l'exposition à la lumière du soleil. Elle a été stockée dans des conditions de réfrigération à 4 °C en vue d'utilisations ultérieures (figure I.03).



Figure I. 03 : Les graines de *Nigella Sativa.L* broyées par le Pulverisette 14 (FRITSCH, Idar-Oberstein, Allemagne)

I.2.3. Produits chimiques et réactifs

Tous les produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude étaient de qualité analytique. Les produits chimiques, y compris le radical 2,20-diphényl-1-picrylhydrazyle

(DPPH*), l'éthanol absolu (99,9 %, v/v) et le carbonate de sodium (Na_2CO_3), ont été achetés auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne). L'eau, l'éthanol et l'acétonitrile de qualité LCMS ont été fournis par Sigma – Aldrich (Steinheim, Allemagne), tandis que l'acide trifluoroacétique (TFA) a été obtenu chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Les composés catéchine, myricétine et quercitrine ont été fournis par HWI ANALYTIK GMBH, tandis que quercétine, épicatechine, acide sinapique, acide caféique et acide gallique ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La routine a été acquise auprès de PhytoLab GmbH & Co (Vestenbergsgreuth, Allemagne).

I.3. Méthodologie

Ce travail d'optimisation est basé sur le plan expérimental suivant comme il est indiqué dans la figure I. 04.

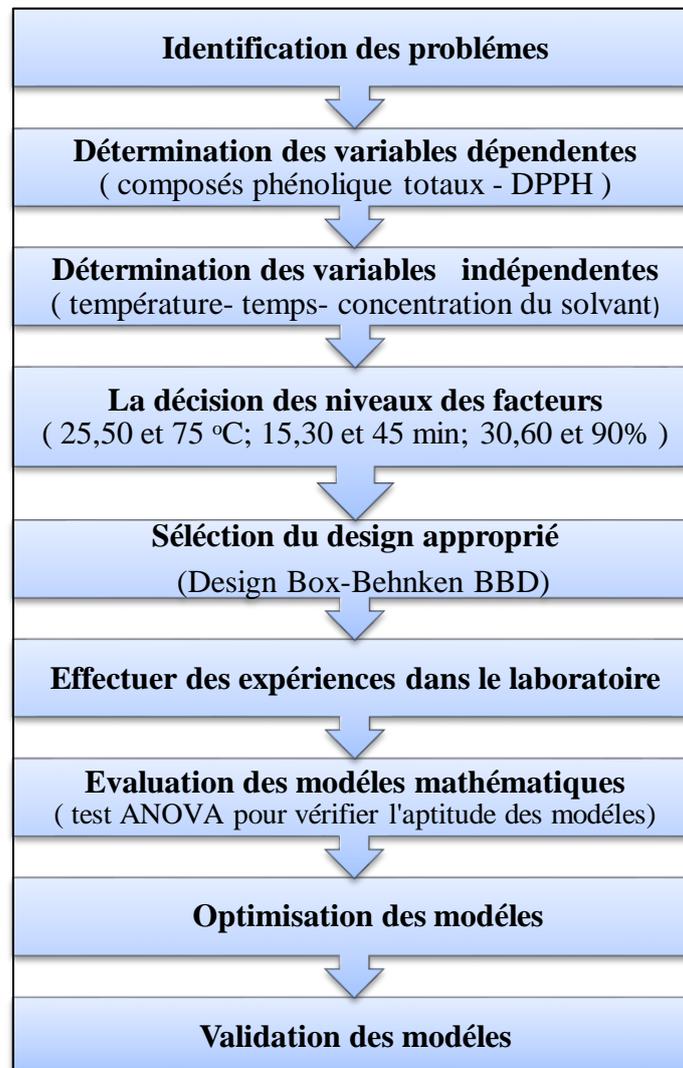


Figure I. 04 : Diagramme général de la procédure expérimentale

I.3.1. Méthode d'optimisation

I.3.1.1. Plan d'expériences

Le plan d'expériences (connu sous le nom de design of experiments ou DOE en anglais) est une approche méthodique et préétablie visant à établir des liens entre divers paramètres qui influent sur une variable donnée [3].

Cette méthodologie implique la manipulation simultanée de plusieurs paramètres à différents niveaux au sein d'une même expérience. Elle est couramment utilisée pour analyser des situations complexes où de multiples facteurs exercent une influence. Plutôt que de tester chaque facteur de manière isolée, un plan d'expériences modifie plusieurs paramètres simultanément, réduisant ainsi le nombre d'essais nécessaires tout en permettant l'exploration des interactions entre ces facteurs [4].

Cette approche fait appel à des matrices de tests, qui peuvent prendre la forme de tableaux factoriels complets (testant toutes les combinaisons possibles) ou de tableaux fractionnaires (explorant une sélection spécifique de configurations factorielles pour minimiser le nombre de tests requis) [5].

I.3.1.2. La méthodologie de surface de réponse (RSM)

La méthodologie de surface de réponse (RSM) est une approche expérimentale qui implique la manipulation de multiples facteurs à divers niveaux au sein d'une même expérience. Elle est fréquemment employée pour étudier des problèmes complexes caractérisés par l'interaction de plusieurs facteurs d'influence [6].

Cette méthodologie repose sur l'utilisation de tableaux de tests spécialement conçus pour évaluer les interactions et les réponses quadratiques entre ces facteurs. En somme, le RSM est une configuration de plan d'expériences permettant une analyse approfondie des relations complexes entre des variables en manipulant simultanément divers paramètres expérimentaux [7].

I.3.1.3. Design Box-Behnken (BBD)

Le design Box-Behnken (BBD) est une configuration de tests expérimentaux spécialement conçue pour la méthodologie de surface de réponse (RSM - Response Surface

Methodology) [8]. Il permet d'explorer les relations entre plusieurs facteurs (variables indépendantes) et une réponse (variable dépendante) en utilisant un nombre minimal d'expériences [9].

Le BBD est caractérisé par la répartition des niveaux des facteurs le long des arêtes d'un cube, avec des points centraux pour évaluer l'effet des interactions. Cette méthodologie vise à modéliser et optimiser les processus complexes en identifiant la meilleure combinaison de facteurs pour maximiser ou minimiser une réponse donnée. En somme, le BBD est un outil essentiel en statistique et en recherche expérimentale pour l'exploration et l'optimisation des réponses dans un espace multivarié (figure I. 05) [10].

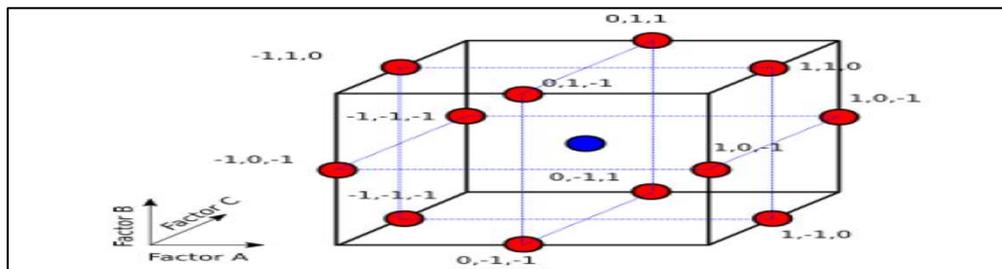


Figure 1. 05 : Image graphique du Design Box-Behnken [11]

I.3.1.4. Modèle mathématique postulé

Le modèle mathématique utilisé dans le cadre du plan de Box-Behnken pour trois facteurs est un modèle du second degré qui établit une relation entre la réponse et les facteurs de la manière suivante (Equation I. 01) [12] :

$$Y = \gamma_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^3 \alpha_{ij} X_i X_j \quad \text{Equation I. 01}$$

Où :

Y : représente la réponse ou la grandeur d'intérêt, qui est mesurée avec une précision définie au cours de l'expérimentation.

X_i, X_j : représentent respectivement les niveaux des variables indépendantes.

α_i, α_{ii}, α_{ij} : sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

I.4. Optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques

Plusieurs facteurs exercent une influence sur le processus d'extraction des composés phénoliques, parmi lesquels on peut citer la méthode d'extraction, le choix du solvant, la durée de l'extraction, la température d'extraction, le rapport entre le solvant et le solide, et d'autres encore [13].

Dans le cadre de notre étude, nous avons établi des paramètres spécifiques pour l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques, comme il est indiqué dans le Tableau I. 01. En utilisant le design de Box-Behnken que nous avons sélectionné, un total de 16 essais ont été conduits, dont trois essais réalisés au point central (0, 0, 0), qui servent à évaluer l'erreur expérimentale, comme il est présenté dans le Tableau I. 02.

Tableau I. 01 : Niveaux de conception expérimentale pour divers paramètres.

Symboles	Variable indépendante	Niveaux		
		-1	0	+1
X1	Concentration d'éthanol (%)	30	60	90
X2	Température d'extraction (°C)	25	50	75
X3	Temps d'extraction (min)	15	30	45

Tableau I. 02 : La matrice du design Box – Behnken (BBD).

Test	Facteurs		
	X1	X2	X3
1	60	25	45
2	30	25	30
3	60	75	15
4	60	50	30
5	30	50	45
6	90	25	30
7	30	50	15
8	60	50	30
9	60	75	45
10	60	50	30
11	60	50	30
12	60	25	15
13	90	75	30
14	90	50	45
15	30	75	30
16	90	50	15

Cette étape consiste à déterminer les meilleures conditions d'extraction des composés phénoliques contenus dans les graines de *Nigella sativa* par l'utilisation de deux méthodes d'extraction qui sont l'extraction conventionnelle et non-conventionnelle (Ultrasons).

I.4.1. Extraction « non-conventionnelle » assistée par ultrason (EAU)

Les ultrasons, qui se situent dans la plage de fréquence de 20 à 100 kHz lorsqu'ils sont utilisés pour extraire des composés bioactifs, sont des ondes mécaniques vibratoires [15]. Ils exercent des effets mécaniques qui favorisent la pénétration accrue du solvant à l'intérieur des matériaux cellulaires. De plus, ils améliorent le transfert de masse [16].

L'utilisation des ultrasons dans le processus d'extraction peut également perturber les parois cellulaires, facilitant ainsi la libération de leur contenu. En conséquence, on considère

que l'efficacité de la rupture cellulaire et du transfert de masse constitue deux des principaux facteurs contribuant à l'efficacité globale de l'extraction lorsque les ultrasons sont utilisés [17].

I.4.1.1. Mode opératoire

Pour extraire les composés phénoliques des graines de *Nigella Sativa.L*, un total de 5 g d'échantillon a été mélangé avec 200 ml de solution (éthanol/eau) à différentes concentrations (30, 60 et 90 %, v/v). Les extractions ont été effectuées en utilisant un bain à ultrasons (modèle UP200S, Hielscher, Berlin, Allemagne) (Annexe I) partiellement rempli d'eau distillée (environ 3,0 dm³) comme il est illustré dans la figure I. 06.

Les procédures d'extraction ont été menées à trois températures ultrasonores différentes (25, 50 et 75 °C) pendant des durées de 15, 30 et 45 minutes, avec une puissance continue de 110 W et une fréquence de 40 kHz. Ensuite, les extraits ont été filtrés à température ambiante en utilisant du papier filtre Whatman n° 01.

La solution filtrée a été récupérée et évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif pendant 30 minutes à 40 °C. Les échantillons restants ont été soumis à un processus de lyophilisation à une température de -80°C pendant 24 heures (Annexe I), puis conservés à 4°C en vue d'expériences ultérieures comme il est indiqué dans les figures I.06 et I.07.

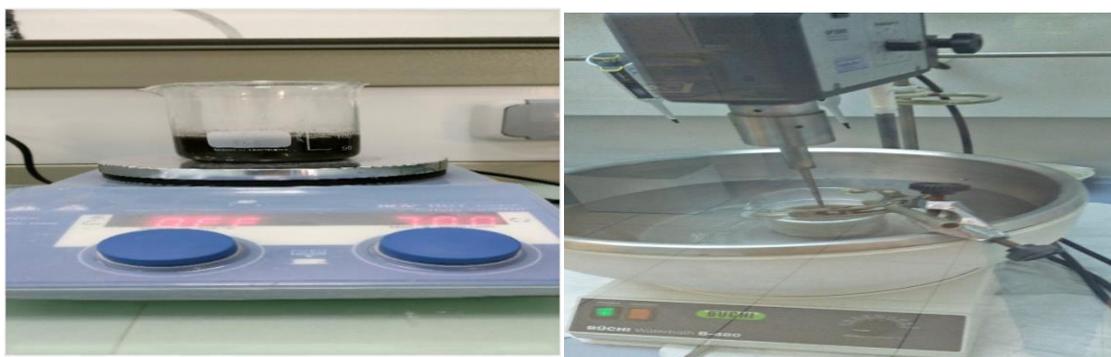


Figure I. 06 : Montage utilisé pour l'extraction des polyphénols par les ultrasons

I.4.1.2. Principe de fonctionnement

Pendant le processus de sonication, les ondes sonores induisent des vibrations mécaniques dans le solide, le liquide ou le gaz, créant des cycles de compression et de raréfaction dans le milieu de propagation de l'onde ultrasonore.

Ces cycles répétitifs donnent naissance à des bulles de cavitation qui se dilatent pendant les phases de raréfaction et se contractent lors des phases de compression [18].

La répétition de ces cycles aboutit à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une quantité significative d'énergie. Les mécanismes d'extraction par ultrasons mettent en jeu deux phénomènes physiques clés :

- Certaines molécules peuvent franchir la paroi cellulaire par simple diffusion.
- La destruction des parois cellulaires permet le lessivage du contenu des cellules, facilitant ainsi la récupération de l'ensemble des composés phénoliques [19,20].

I.4.1.3. Effet de la concentration du solvant sur l'extraction des composés phénoliques

En explorant différents mélanges d'éthanol et d'eau (30%, 60%, et 90%) avec le solvant optimal, nous avons évalué l'effet du pourcentage de solvant sur l'activité antioxydante et la teneur totale en composés phénoliques.

La concentration optimale du solvant a été déterminée en sélectionnant celle qui présentait la plus haute activité antioxydante et la plus grande quantité de composés phénoliques totaux [21].

I.4.1.4. Effet du temps d'extraction sur l'extraction des composés phénoliques

La durée de l'extraction a été modifiée, couvrant des périodes de 15, 30 et 45 minutes. Les étapes d'extraction ont été réalisées conformément à la méthode précédemment décrite.

Le temps optimal d'extraction a été sélectionné en se basant sur la plus haute valeur d'activité antioxydante et la quantité maximale de composés phénoliques totaux [22].

I.4.1.5. Effet de la température d'extraction sur l'extraction des composés phénolique

L'extraction a été réalisée à différentes températures, à savoir 25, 50 et 75°C. La température optimale d'extraction a été déterminée en se basant sur la plus grande valeur d'activité antioxydante et la plus grande quantité de composés phénoliques totaux [23].

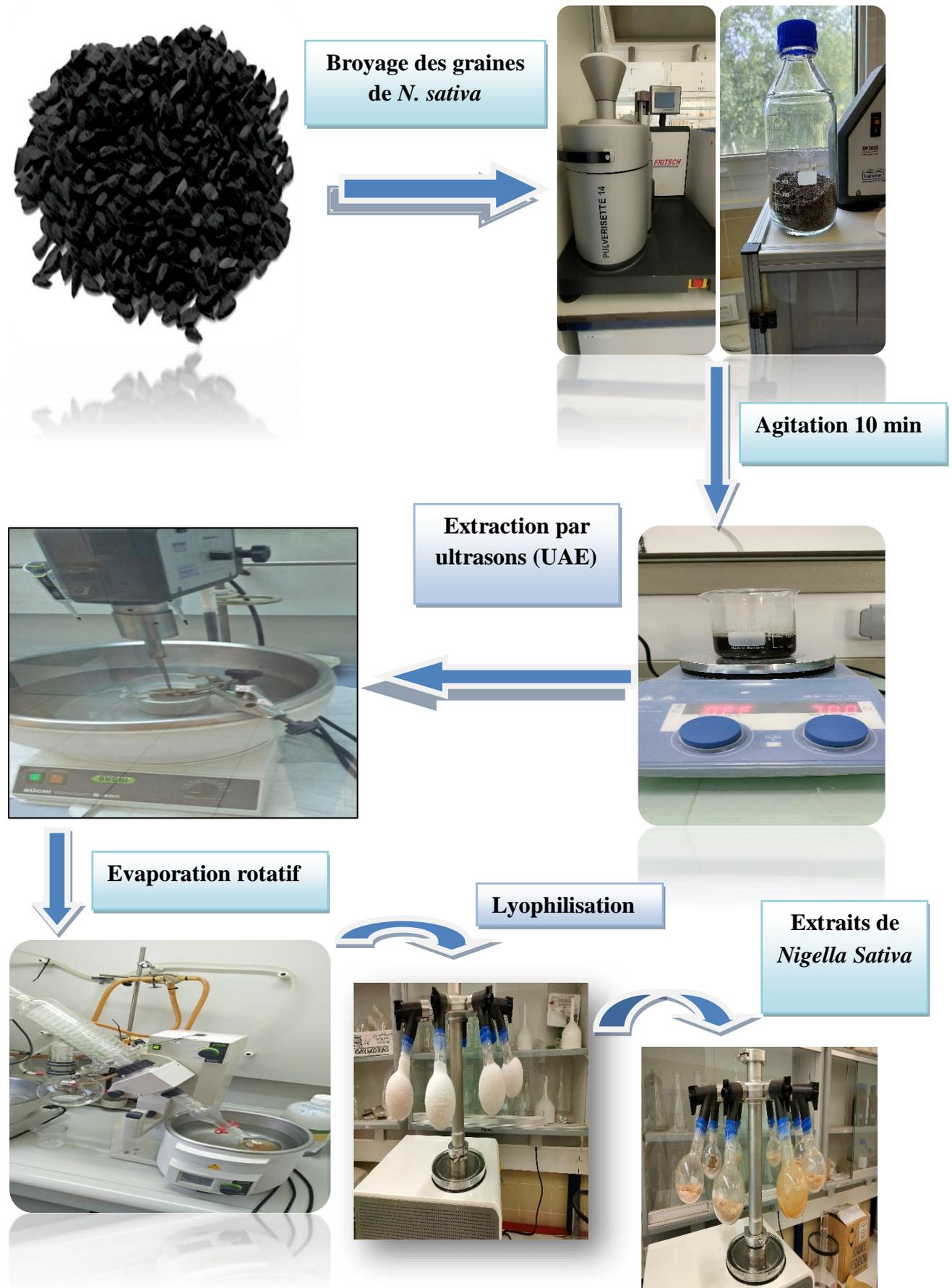


Figure I.07 : Schéma représentant les étapes de préparation des extraits de *N. sativa*

I.4.2. Extraction « conventionnelle » par décoction

La méthode d'extraction conventionnelle a été suivie selon le protocole suivant : 5 g de l'échantillon ont été introduits dans une fiole conique et mélangés avec 200 mL d'une solution d'éthanol à 50 % (v/v). Ensuite, le mélange a été agité pendant 2 heures à une température de 50 °C (Figure I.08), suivi d'une filtration à travers un papier filtre de type Whatman n°1.

La solution filtrée a été recueillie, puis soumise à un processus d'évaporation en utilisant un évaporateur rotatif. Enfin, le résidu a été lyophilisé à une température de -80 °C, et conservé à 4 °C en vue d'analyses ultérieures [14].

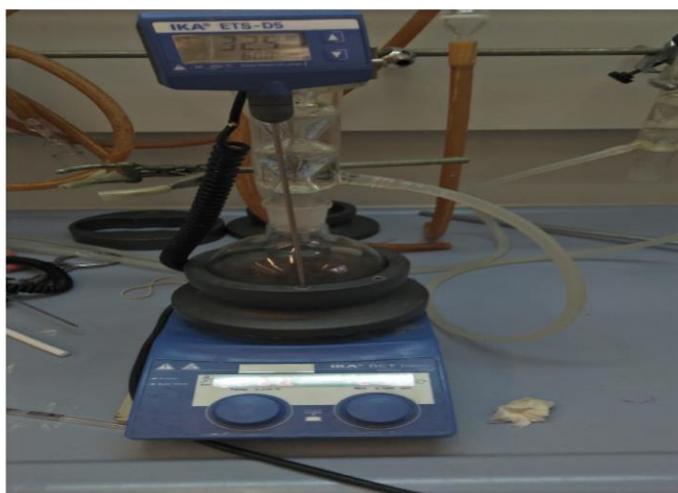


Figure I.08 : Extraction conventionnelle par « décoction »

I.5. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse obtenue par extraction et la masse totale du matériel végétal traité. Il est calculé à l'aide de la formule suivante (Equation I.02) [20] :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{ME}{MS} * 100 \quad \text{Equation I.02}$$

Où :

ME : Masse d'extrait (g).

MS : Masse de la matière végétale sèche (g).

I.6. Détermination de la concentration en composés phénoliques totaux (TPC)

I.6.1. Principe

La quantité totale de polyphénols a été mesurée en utilisant la méthode spectrophotométrique de Singleton et Ross, qui repose sur la réaction colorimétrique avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Cette méthode permet de déterminer la concentration globale des groupes hydroxyles présents dans l'extrait [24]. La solution absorbe à une longueur d'onde de 756 nm. Par conséquent, pour mesurer les polyphénols totaux, l'absorbance de la solution en cours d'analyse est comparée à celle d'un étalon, qui est l'acide gallique [25].

I.6.2. Mode opératoire

Les composés phénoliques totaux ont été quantifiés en utilisant la méthode du test de Folin-Ciocalteu. Pour chaque échantillon, 1 ml de l'échantillon, contenant une solution standard d'acide gallique à une concentration de 1,0 mg/ml, a été mélangé avec 0,5 ml du réactif Folin-Ciocalteu, puis laissé à température ambiante pendant 3 minutes.

Ensuite, une solution de Na_2CO_3 à une concentration de 7,5 % (p/v) a été préparée, chauffée pendant 1 minute à 95 °C, et refroidie à température ambiante. Par la suite, 1,0 ml de cette solution de Na_2CO_3 à 7,5 % a été ajouté à chaque échantillon (Figure I. 09).

Après une incubation d'une heure à température ambiante dans un endroit sombre, l'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à une longueur d'onde de 760 nm à l'aide d'un spectromètre UV-Vis (V-750 spectrophotomètre, Jasco, Tsukuba, Japon) (Annexe I). L'acide gallique (exprimé en mg) a été utilisé comme étalon pour établir la courbe d'étalonnage (Figure I. 10). La teneur en composés phénoliques totaux (TPC) des extraits a été exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique (GAE) par gramme d'échantillon en poids sec (mg EAG/g) [26].



Figure I.09 : Dosage des polyphénols totaux des graines de *N. sativa*

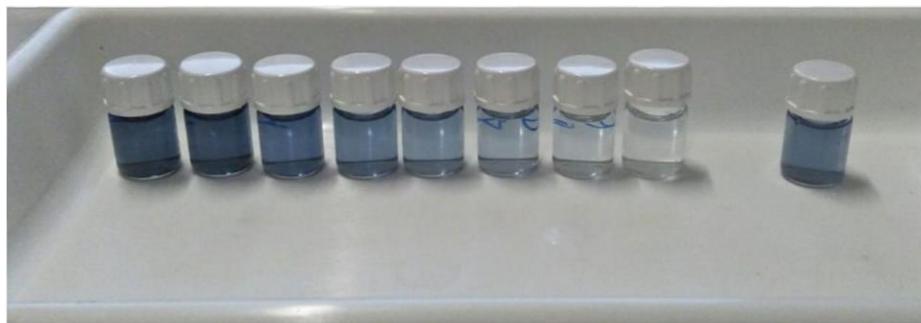


Figure I.10 : Solution du standard d'acide gallique à différentes concentrations

I.6.3. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Cette courbe est établie en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g MS). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,992$ comme il est représenté dans la figure I. 11.

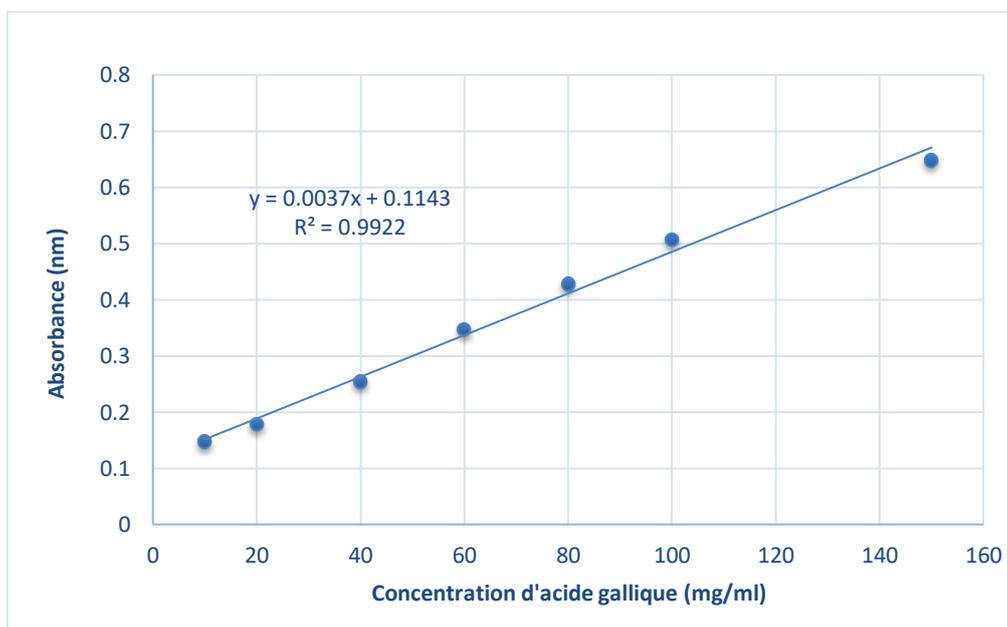


Figure I. 11 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

I.7. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle)

Dans le cadre de cette étude, l'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée en utilisant la méthode chimique du piégeage du radical libre DPPH. Il existe différentes méthodes pour évaluer cette activité, et nous avons opté pour celle-ci.

I.7.1. Principe

Nous avons évalué l'activité anti-radicalaire en utilisant le radical libre DPPH*, qui a été l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation entre la structure et l'activité antioxydante [27].

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable qui possède un électron non apparié sur un atome de l'azote. Cette particularité empêche sa polymérisation, le maintenant sous forme de monomère relativement stable à température ambiante. Cette caractéristique se traduit par une couleur violette foncée bien reconnaissable dans la solution de DPPH*. En présence d'antioxydants, le DPPH* subit une réduction, ce qui fait disparaître cette couleur violette au profit d'une teinte jaune pâle propre au groupe picryl (figure I.12) [28].

L'intensité de cette couleur jaune est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à libérer des protons. La réaction de délocalisation est suivie en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm à l'aide de la spectrophotométrie [29].

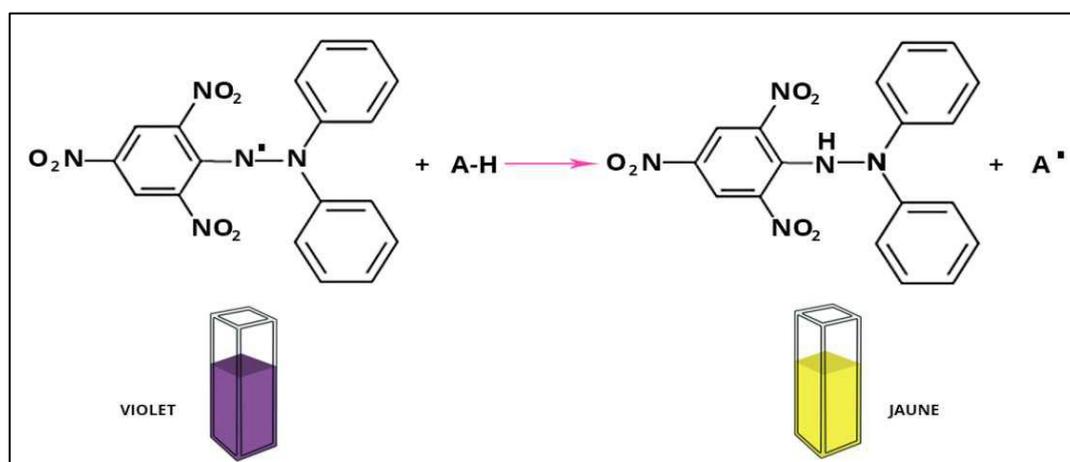


Figure I. 12 : Mécanisme d'action du DPPH* [29]

I.7.2. Mode opératoire

L'activité de piégeage des radicaux DPPH a été évaluée de la manière suivante : En résumé, 2 mL d'une solution méthanolique de 0,25 mmol/L de DPPH* ont été mélangés avec 1 mL d'extrait de graines de cumin noir, agités vigoureusement, puis laissés à température ambiante (25 °C) dans un endroit obscur pendant 30 minutes (Figure I. 13).

Un échantillon témoin a été préparé sans l'ajout d'extraits, et les mélanges d'échantillons ainsi que le témoin ont été analysés pour déterminer leur absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre V-750 (Jasco, Tsukuba, Japon) [30].

Pour calculer le pourcentage de DPPH* que les extraits de graines de cumin noir ont neutralisé, nous avons utilisé l'équation I.03.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{control}}} * 100 \quad \text{Equation 1.03}$$

Avec :

A_{Control} : est l'absorbance de la solution méthanolique DPPH*.

A_{Extrait} : est l'absorbance des extraits mesurés [31].

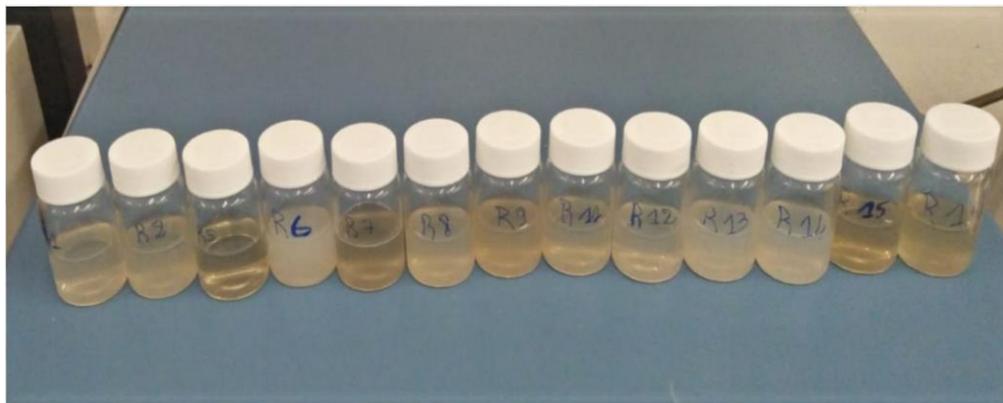


Figure I.13 : Différentes concentrations d'extrait de *N. sativa* pour le test du DPPH*

I.8. Méthodes d'analyse physico-chimiques

I.8.1. Analyse par chromatographie

La chromatographie est une technique de séparation physique des éléments d'un mélange, exploitant les distinctions dans les préférences des substances à analyser envers deux phases distinctes : une phase fixe, également appelée phase stationnaire, et une phase mobile [32].

I.8.2. Principe

La chromatographie sépare les molécules d'un mélange en fonction de leurs vitesses de déplacement. Les molécules se fixent à la phase stationnaire et sont ensuite libérées par un solvant, créant une répartition des composants avec des vitesses de transfert variables. Les constituants sont récupérés individuellement en fractions. Notre étude utilise la chromatographie liquide haute performance (HPLC) [33].

I.8.3. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) utilise deux phases, mobile et stationnaire, sous haute pression pour séparer les solutés. La séparation dépend de facteurs tels que l'affinité des solutés pour l'éluant, leur polarité et leur charge électrique. Après la séparation, les solutés sont détectés et quantifiés via un détecteur connecté à la colonne chromatographique. En résumé, le mélange à séparer est injecté dans la colonne, transporté par la phase mobile, et les composants sont identifiés en fonction de leurs taux d'adsorption et de désorption. Le résultat est un chromatogramme représentant chaque composant en fonction de son temps de rétention [34].

I.8.4. Appareillage

L'HPLC (chromatographie liquide à haute performance) est composée des éléments suivants [33] :

- La colonne : Habituellement, cette composante est un tube en acier d'une longueur de 5 à 15 cm et d'un diamètre de 5 mm, contenant une phase stationnaire. Plusieurs types de phases stationnaires sont disponibles, dont :
 - Les silices non greffées.
 - Les silices greffées avec des groupes polaires, nécessitant un éluant apolaire, ce qui correspond à la chromatographie en phase normale.

- Les silices greffées avec des groupes apolaires (chaînes carbonées linéaires de différentes longueurs), nécessitant un éluant polaire, créant ainsi la chromatographie en phase inverse.
- Injecteur : Il comprend une vanne haute pression, appelée vanne Rhéodyne, et une boucle d'échantillonnage d'une capacité de 10 à 50 μl . Une fois remplie, cette boucle permet d'injecter l'échantillon à l'entrée de la colonne sans perte de pression.
- La pompe : Elle a pour rôle d'introduire la phase mobile dans l'appareil à un débit constant et à haute pression.
- Détecteur : Plusieurs types de détecteurs sont disponibles, notamment :
 - Les détecteurs à absorption dans l'UV-Visible.
 - Les réfractomètres différentiels.
 - Les détecteurs électrochimiques.

I.8.5. Détermination du profil phénolique

La méthode analytique actuelle a été validée en fonction de la linéarité, de la limite de détection, de la limite de quantification et de la précision en termes de reproductibilité (validation intrajournalière) et (validation interjournalière).

Pour le dosage intrajournalier, six analyses HPLC successives des solutions standard ont été réalisées le même jour, tandis que dans le cas de la validation interjournalière, l'analyse a été réalisée sur cinq jours consécutifs.

Au moins cinq concentrations différentes ont été préparées pour chaque analyte. Les limites de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ), utilisées pour évaluer la sensibilité de la méthode, ont été calculées en fonction de l'écart type de la réponse et de la pente d'étalonnage correspondant [35]. Les limites de détection ont été exprimées comme suit :

$$(1) LD = 3,3 / \text{Pente}$$

$$(2) LQ = 10 / \text{Pente}$$

I.8.6. Mode opératoire de l'analyse HPLC-UV

Pour l'analyse chromatographique, 8 mg des échantillons lyophilisés ont été dissous dans 1 ml d'éthanol. Les solutions finales ont été filtrées à travers des filtres seringues en PTFE de 0,45 µm de taille de pores (filtres à seringues LLG SPHEROS, Mechenheim, Allemagne) et analysées via le système HPLC-UV [36].

L'existence polyphénoliques de neuf composés a été réalisée à l'aide d'un système HPLC de Shimadzu (Kyoto, Japon), équipé d'une pompe (LC-10AD), d'un détecteur PDA (SPD-M20A), d'un passeur d'échantillons (SIL-20AHT) et d'un compartiment colonne du thermostat (CTO-10ASVP). Le détecteur PDA a été réglé à 280 nm pour la détermination de tous les analytes. Pour la séparation chromatographique, une colonne Venusil XBP C18 (150 µm, 4,6 mm, 5 m) et une pré-colonne composée du même matériau ont été utilisées.

La phase mobile A était constituée d'eau Milli Q tandis que la phase mobile B était de l'ACN avec 0,02 % de TFA. La méthode fonctionnait avec un débit de 1,0 mL/min, alors que les injections étaient de 20 µL. Les conditions initiales de l'élution en gradient étaient de 80 % A pendant les cinq premières minutes, suivies d'une diminution progressive à 60 % A jusqu'à 8 min, après, il y a eu une nouvelle diminution à 50 % A jusqu'à 12 min, et enfin une augmentation à 60 % jusqu'à 17 min.

Le rapport des phases mobiles a été réinitialisé à la composition d'origine à 21 min, où il est resté constant jusqu'à 25 min.

I.9. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de *Nigella sativa*

I.9.1. Généralités

Les microbes, ou micro-organismes, constituent une catégorie d'organismes de taille microscopique. Leur observation nécessite l'utilisation d'un microscope en raison de leur taille extrêmement réduite.

Ces entités jouent un rôle crucial dans divers aspects de la vie, tels que le cycle géochimique, la fertilité des sols, la production alimentaire, la fabrication de composants pharmaceutiques et industriels, tout en étant impliqués dans des maladies potentielles chez les plantes, les animaux et les contaminations alimentaires [37].

En ce qui concerne le traitement des infections bactériennes, il repose principalement sur l'utilisation d'antibiotiques. La prescription excessive, parfois inappropriée, de ces médicaments peut entraîner la sélection de souches multirésistantes.

C'est pourquoi il est impératif d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles approches, qui offrent une source d'inspiration pour le développement de nouveaux médicaments à base de plantes [38].

I.9.2. Culture des bactéries :

Pour cultiver des bactéries, on utilise fréquemment des milieux complexes contenant des extraits ou des hydrolysats enzymatiques de viandes, se présentant soit sous forme liquide (bouillons) ou solide [39]. L'agar, un extrait d'algues, est ajouté pour solidifier les milieux, fondant à haute température et se solidifiant en dessous de 40°C [40].

Dans les milieux liquides, les bactéries se dispersent librement, donnant une turbidité homogène. En milieu solide, à faible densité bactérienne, chaque bactérie peut se reproduire pour former des amas visibles à l'œil nu, appelés colonies. Une densité élevée peut conduire à la formation d'une nappe continue. Les milieux solides facilitent le comptage des bactéries viables dans un échantillon. [41].

I.9.3. Les souches testées

Les souches testées dans cette étude sont représentées dans le tableau I. 03

Tableau 1.03 : Généralités sur les souches utilisées

<i>Souches bactériennes testées</i>	<i>Caractères bactériologiques</i>	<i>Habitats</i>	<i>Pouvoir pathogène</i>
Escherichia coli	Gram -	- Le tube digestif	- Septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastroentérites. - Douleurs abdominales et des diarrhées sanglantes.
Staphylococcus aureus	Gram +	- Les fosses nasales - La gorge - Le tube digestif	- Infection hospitalière. - Responsable des abcès, des plaies, des septicémies, de pneumonie et de l'intoxication alimentaire.

I.9.4. Notion du bactériostatique et du bactéricide

Lorsque l'antibiotique limite seulement la croissance des bactéries, on évoque l'effet bactériostatique. En revanche, si l'antibiotique conduit à la mort des bactéries, on parle alors de l'effet bactéricide [42].

I.9.4.1. L'effet bactériostatique

C'est une réaction bactérienne au cours de laquelle il n'y a pas de destruction directe des bactéries, mais plutôt une entrave à leur croissance. Cette croissance reprend dès que la substance disparaît [43].

I.9.4.2. L'effet bactéricide

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'antibiotique utilisées in vivo ou in vitro, s'il persiste moins de 0.01% de survivants après 18 h de culture [43].

I.9.5. Activité antimicrobienne des extraits

Les extraits de plantes démontrent une notable activité antimicrobienne, principalement attribuée à la présence de polyphénols. Il est supposé que la nature et le nombre de groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont liés à leur toxicité relative envers les micro-organismes [44].

Le mécanisme sous-jacent des effets antimicrobiens des polyphénols est vraisemblablement d'une grande complexité. Plusieurs hypothèses ont été avancées, notamment, l'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique résultant de l'insertion des polyphénols au sein des phospholipides membranaires, ainsi la perturbation de la synthèse de l'acide nucléique et aussi la capture des substrats essentiels à la croissance microbienne [45].

I.9.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode d'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode qui vise à évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits de plantes. Il est semblable à l'antibiogramme, une méthode utilisée pour tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Dans un aromatoigramme, un disque ou un support est imprégné d'une huile essentielle ou d'un extrait de plante, puis placé sur une gélose contenant des bactéries. On mesure ensuite la zone d'inhibition de la croissance bactérienne autour du disque, ce qui permet d'évaluer l'efficacité de l'huile essentielle ou de l'extrait contre les bactéries testées [46].

I.9.6.1. Principe

Le principe de cette méthode repose sur la diffusion d'un composé ayant des propriétés antibactériennes au sein d'un milieu solide contenu dans une boîte de Pétri. Après un temps de contact défini entre le produit et le micro-organisme cible, l'activité antibactérienne est évaluée en mesurant la taille de la zone d'inhibition, qui est directement liée au diamètre de cette zone [46].

I.9.6.2. Mode opératoire

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique (R4) obtenu dans les conditions optimales des gaines de *Nigella Sativa*, nous avons utilisé la méthode d'aromatogramme, c'est une méthode de diffusion (disques et puits) sur milieu gélosé.

I.9.6.3. Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture bactérienne récente de 18 heures, on crée des suspensions troubles en prélevant 3 à 4 colonies bien isolées et identiques, que l'on transfère dans un bouillon nutritif (Figure I. 14), suivi d'une agitation au vortex.

Ensuite, on effectue une première mesure de la concentration de la suspension en utilisant un spectrophotomètre pour évaluer la transmittance.

Cette dernière devrait idéalement se situer entre 22% et 32% pour les bactéries, à une longueur d'onde de 620 nm. Ces valeurs, lorsqu'elles se trouvent dans les plages mentionnées ci-dessus, correspondent à une concentration optimale allant de 0,08 à 0,1 à 620 nm, soit environ 10^8 UFC/ml.

Si l'une des valeurs obtenues lors de la première lecture ne se situe pas dans cette plage, on l'ajuste en ajoutant soit du bouillon nutritif s'il s'agit d'une valeur inférieure à la limite minimale, soit des colonies s'il s'agit d'une valeur dépassant la limite maximale.

On répète la mesure de la transmittance à chaque ajustement de la suspension jusqu'à ce qu'elle atteigne les valeurs souhaitées. Il est essentiel d'utiliser l'inoculum dans les 15 minutes suivant sa préparation [47].

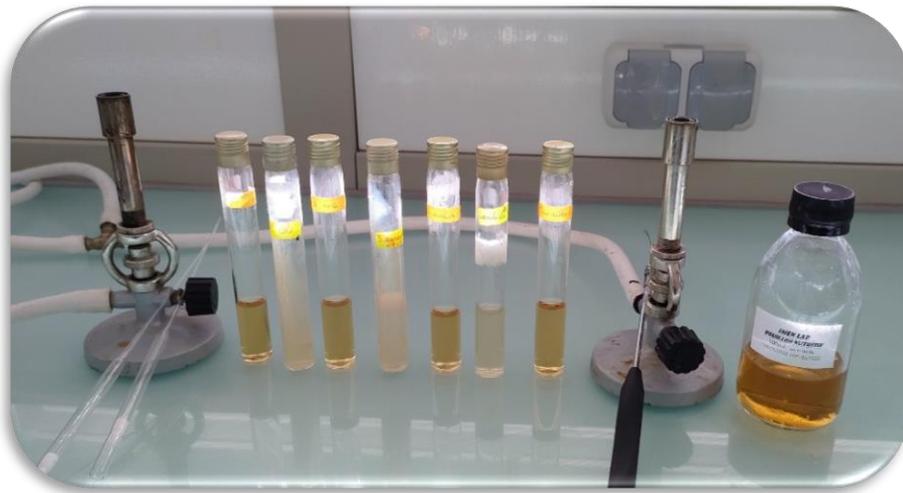


Figure I .14 : Préparation de l'inoculum bactérien pour l'aromatogramme

I.9.6.4. Ensemencement

Après avoir inséré un écouvillon stérile dans l'inoculum ajusté au niveau de l'opacité standard du témoin, éliminez l'excès de bouillon en exerçant une légère pression sur les parois du tube.

Procédez à l'ensemencement de la gélose, puis passez l'écouvillon deux fois sur toute la surface, en faisant pivoter la boîte deux fois de 90 degrés pour garantir une répartition uniforme de l'inoculum. Attendez que les boîtes sèchent pendant 10 minutes avant de placer les disques (Figure I.15) [47].

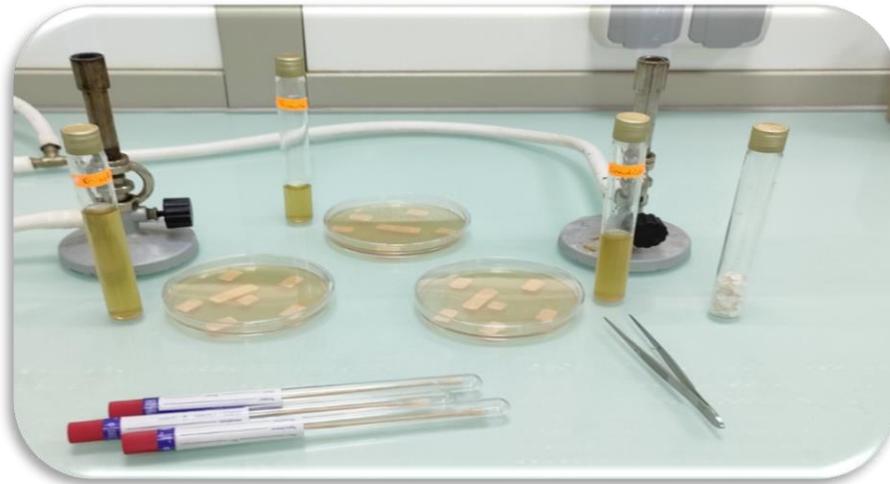


Figure 1.15 : Boîtes de pétrie ensemencées

I.9.6.5. Dépôt des disques

En utilisant une pince stérile, les disques portant diverses concentrations d'extrait ont été placés délicatement à la surface des boîtes de Petri déjà ensemencées avec les souches à tester. Les disques ont été positionnés en exerçant une légère pression pour assurer une bonne adhérence à la gélose comme il est indiquée dans la figure I. 16 [47].

Il est important de veiller à ce que les disques soient positionnés à une distance minimale de 15 mm du bord de la boîte, de manière à éviter tout chevauchement des zones d'inhibition [48].

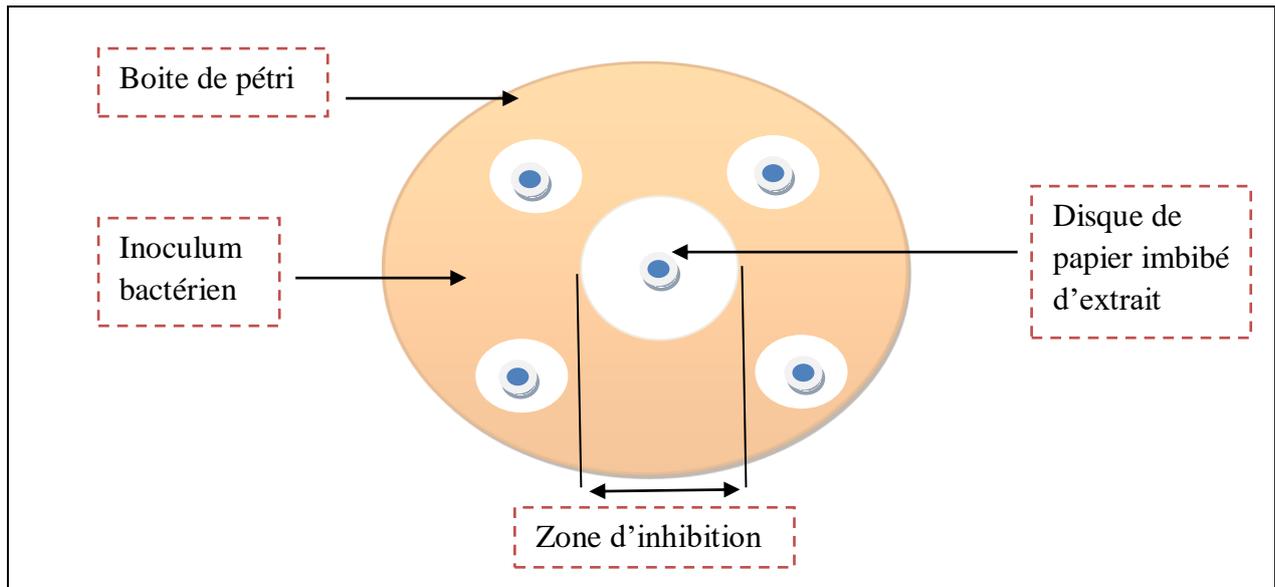


Figure I.16 : Principe de la méthode de diffusion par disque

I.9.6.6. Les différentes concentrations d'extrait utilisées

- ✓ C1 : 25 mg/ml
- ✓ C2 : 50 mg/ml
- ✓ C3 : 100 mg/ml
- ✓ C4 : 150 mg/ml
- ✓ C5 : 200 mg/ml

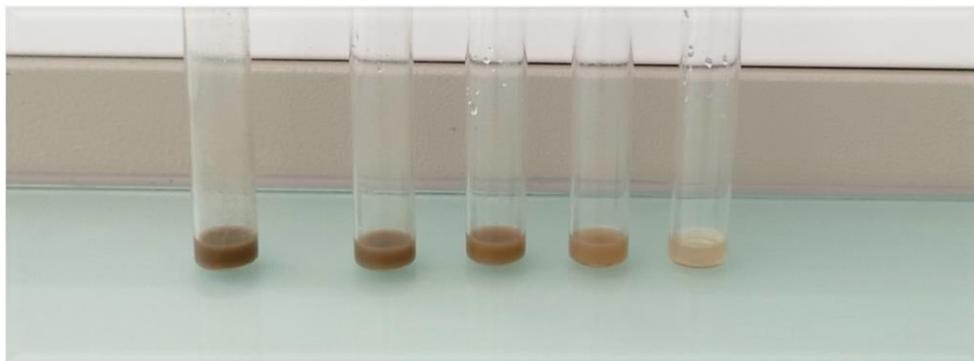


Figure I.17: Différentes concentrations d'extrait éthanolique de *Nigella Sativa*

La gélose de Mueller Hinton stérile est coulée dans des boîtes de pétri à raison de 15 ml par boîte, puis laissées refroidir. L'inoculum bactérien, ajusté à 0.5 Mc Farland qui correspond à une concentration de 10^8 UFC/ml, puis on fait une dilution de 10^6 UFC/ml. La

charge microbienne est frottée sur la totalité de la surface du Mueller Hinton de haut en bas en stries serrées.

A l'aide d'une pince stérile, les disques imprégnés avec les différentes concentrations de l'extrait éthanolique de *Nigella Sativa*, ont été déposés à la surface des boîtes de pétri ensemencées par les souches à tester.

I.9.6.7. Incubation et lecture

Les boîtes sont ensuite scellées et laissées à température ambiante pendant une période de 30 minutes, après elles sont transférées dans une étuve réglée à une température de 37°C, où elles restent incubées pendant 24 heures.

Pour évaluer les résultats, la lecture se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque en millimètres (Tableau I.04). Les données sont exprimées en fonction de ces mesures, et des symboles sont utilisés pour indiquer la sensibilité des souches [49].

Tableau I.04 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition.

Sensibilité	Zone d'inhibition
Non sensible ou résistante (-)	Diamètre < 8mm
Sensible (+)	Diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	Diamètre compris entre 15 à 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	Diamètre > 20 mm

I.9.7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

I.9.7.1. Principe

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien capable d'arrêter de manière visible la croissance d'un micro-organisme après une période de 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour les levures.

Son objectif est d'évaluer le degré de sensibilité des pathogènes à l'égard des agents antimicrobiens, notamment les huiles essentielles et les extraits en cours de test. Pour

déterminer cette CMI, la méthode des dilutions est employée sur des milieux spécifiques, à savoir le MH pour les bactéries et le SAB pour les levures [50].

I.9.7.2. Mode opératoire

I.9.7.3. Préparation des précultures

Les souches à évaluer ont été suspendues dans du bouillon nutritif puis placées en incubation à 37°C pour vérifier leur vitalité. Après une période de 24 heures, de petites gouttes de la suspension ont été déposées sur la gélose nutritive et ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures supplémentaires [50].

I.9.7.4. Préparation de l'inoculum

Après l'incubation, les colonies clairement distinctes sont transférées dans un bouillon nutritif jusqu'à atteindre une densité optique comprise entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui équivaut approximativement à 10^8 unités formant des colonies (UFC) par millilitre. Cette opération permet d'obtenir deux concentrations bactériennes distinctes [47].

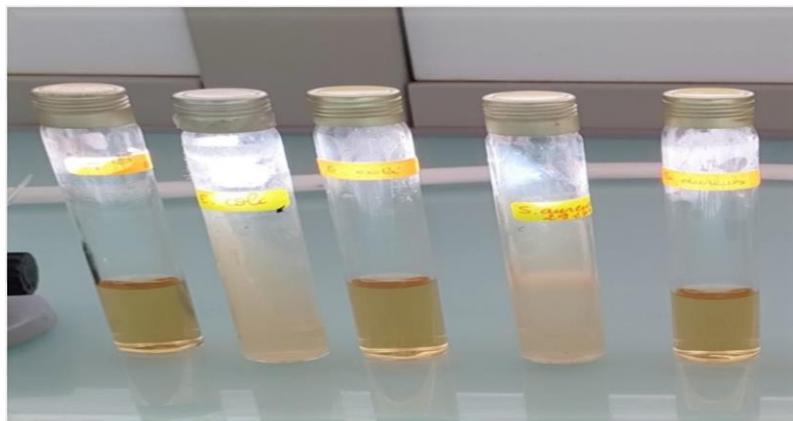


Figure I.18 : Préparation de l'inoculum bactérien pour la CMI

I.9.7.5. Préparations de l'extrait à tester

Une solution-mère de concentration de 300 mg/mL à partir de l'extrait éthanolique brut, a été préparé dans un solvant DMSO pure et stérile, pour en faciliter la solubilisation, puis stérilisés à l'autoclave durant 15 mn à 121°C (figure I. 19).

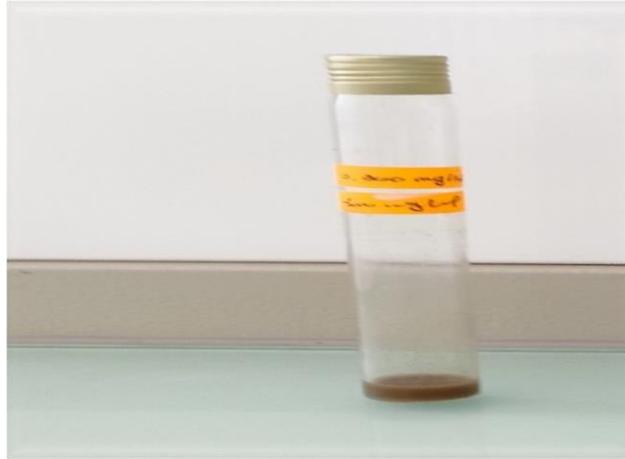


Figure I.19 : Extrait éthanolique de *Nigella Sativa*

I.9.7.6. Détermination de la CMI par la méthode de microdilution

Le test de microdilution dans des microplaques à 96 puits, a été utilisé pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI), afin de déduire le pouvoir antibactérien de l'extrait des graines de *Nigella Sativa.L* Cinquante microlitres de milieu Mueller Hinton Broth (MHB) ont été déposés dans tous les puits de la microplaque. 50 μ L de la solution mère d'extrait, a été déposés dans le 1er puits. Après mélange, 50 μ l du mélange ont été prélevés et dilués dans le puits suivant et ainsi de suite de sorte à obtenir une gamme de concentration de notre extrait allant de 150 mg/mL à 0,073 mg/mL. Ensuite 50 μ L de la suspension bactérienne ont été ajoutés dans chaque puits (Figure I.20).

Les microplaques couvertes avec du papier para film et placées à l'étuve à 37 °C pour être incubées pendant 18 heures. La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche bactérienne donnée est la plus petite des concentrations qui ne montre aucune croissance visible de la bactérie à l'œil nue [51].

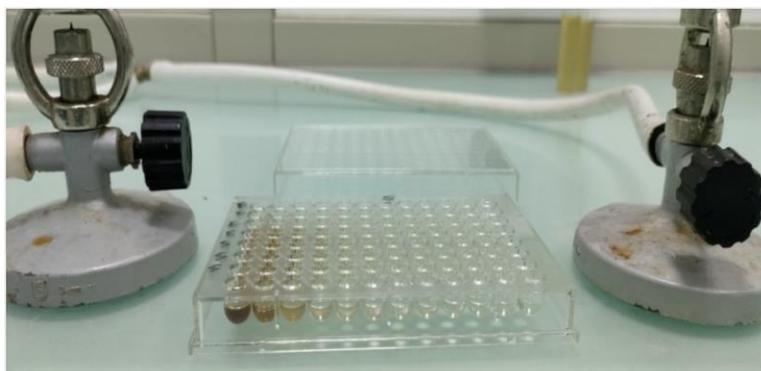


Figure I.20 : Evaluation du pouvoir antibactérien avec une microplaque à 96 puits

I.10. Conclusion

Notre recherche a débuté par une méthodologie rigoureuse pour extraire les composés phénoliques des graines de *Nigella sativa*. Les graines ont été broyées pour obtenir une poudre fine, puis soumises à un processus d'extraction par ultrasons. Cette méthode d'extraction a été optimisée en variant des paramètres tels que la température, le temps d'extraction, et la concentration du solvant utilisé. Les conditions optimales ont été déterminées pour maximiser le rendement d'extraction de ces composés phénoliques précieux.

Une fois les extraits obtenus, des analyses physico-chimiques approfondies ont été menées pour caractériser les composés phénoliques. Cela comprenait l'évaluation de la teneur totale en polyphénols et la mesure de l'activité antioxydante à l'aide de différentes méthodes, ainsi une analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été effectuée pour identifier et quantifier les composés phénoliques spécifiques présents dans les extraits de graines de *Nigella sativa*. Cela a permis d'obtenir une compréhension détaillée de la composition chimique des extraits et de relier les composés phénoliques aux activités biologiques observées.

Enfin, pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique des graines de *N. sativa*, des tests ont été réalisés contre un éventail de micro-organismes pathogènes, notamment des bactéries de gram+ et de gram-. Les essais de sensibilité ont permis de déterminer l'inhibition de la croissance bactérienne et la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) pour les bactéries testées.

L'ensemble de ces étapes a contribué à une meilleure compréhension des propriétés des composés phénoliques extraits des graines de *Nigella sativa*, à la fois en termes de leur potentiel antioxydant et de leurs propriétés antimicrobiennes. Ces informations sont essentielles pour explorer les applications potentielles de cet extrait dans des domaines variés, tels que la médecine, la nutrition, ou encore la cosmétique.

Références bibliographiques

- [1] Benarima, A. (2021). Optimisation des conditions ultrasoniques d'extraction des composés phénoliques de *Moringa Oleifera* et leur activité antioxydante (Doctoral dissertation, University of Eloued).
- [2] https://fr.getamap.net/cartes/algeria/mostaganem/_chouachi_foret
- [3] Khanahmadi, M., Ghaffarzadegan, R., Khalighi-Sigaroodi, F., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., & Hajiaghvae, R. (2018). Optimization of the Glycyrrhizic Acid Extraction from Licorice by Response Surface Methodology. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (Ijce)*, 37(1), 121-129
- [4] Goleij, M., & Fakhraee, H. (2017). Response Surface Methodology Optimization of Cobalt (Ii) and Lead (Ii) Removal from Aqueous Solution Using Mwcnt-Fe₃o₄ Nanocomposite. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (Ijce)*, 36(5), 129-141.
- [5] Nuapia, Y., Cukrowska, E., Tutu, H., & Chimuka, L. (2020). Statistical Comparison of Two Modeling Methods on Pressurized Hot Water Extraction of Vitamin C And Phenolic Compounds from *Moringa Oleifera* Leaves. *South African Journal of Botany*, 129, 9-16.
- [6] Ashrini, B. S., & Varalakshmi, K. N. (2019). Statistical Optimization of Media Components by Taguchi Design and Response Surface Methodology for Enhanced Production of Anticancer Metabolite by *Penicillium Sp.* *Jufp2. Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(2), 463-471.
- [7] Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X. (2008). Optimisation of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Wheat Bran. *Food Chemistry*, 106(2), 804-810.
- [8] Pandey, A., Belwal, T., Sekar, K. C., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2018). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction (Uae) Of Phenolics and Antioxidant Compounds from Rhizomes of *Rheum Moorcroftianum* Using Response Surface Methodology (Rsm). *Industrial Crops and Products*, 119, 218-225.
- [9] Aybastier, Ö. Işık, E., Sahin, S., & Demir, C. (2013). Optimization Of Ultrasonic-Assisted Extraction Of Antioxidant Compounds From Blackberry Leaves Using Response Surface Methodology. *Industrial Crops and Products*, 44, 558-565.
- [10] Wang, X., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q., & Wu, Q. (2013). Optimisation of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Sparganii Rhizoma* with Response Surface Methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(3), 846-854.

- [11] Benkerrou, F., Amrane, M., & Louaileche, H. (2018). Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Phenolic Contents from Phoenix Dactylifera and Evaluation of Antioxidant Activity: Statistical Optimization of Extraction Process Parameters. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 1910-1916.
- [12] Benarima, A., Laouini, S. E., Seghir, B. B., Belaiche, Y., Ridha Ouahrani, (2020). Optimization Of Ultrasonic-Assisted Extraction Of Phenolic Compounds From Moringa Oleifera Leaves Using Response Surface Methodology. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 13(5), 307-311.
- [13] Wang, J., Zhao, Y. M., Guo, C. Y., Zhang, S. M., Liu, C. L., Zhang, D. S., & Bai, X. M. (2012). Ultrasound-Assisted Extraction of Total Flavonoids from Inula Helenium. *Pharmacognosy Magazine*, 8(30), 166.
- [14] Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.
- [15] Xiao, S., Zhang, Y., Xie, J., & Wen, Z. (2018). Ultrasonic-Assisted Extraction of Squalene and Vitamin E Based Oil from Zizyphi Spinosae Semen and Evaluation of Its Antioxidant Activity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2844-2854.
- [16] Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., & Wang, Z. (2007). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins in Red Raspberries and Identification of Anthocyanins in Extract Using High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6), 767-778.
- [17] Amiri, S., Shakeri, A., Sohrabi, M. R., Khalajzadeh, S., & Ghasemi, E. (2019). Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction of Fatty Acids from Aesculus Hippocastanum Fruit By Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, 271, 762-766.
- [18] Hossain, M. B., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'donnell, C. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Marjoram (*Origanum Majorana* L.) Using Response Surface Methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 582-590.
- [19] Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R. (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28.

- [20] Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.
- [21] Rebey, I. B., Sriti, J., Besbess, B., Mkaddmini Hammi, K., Hamrouni Sellami, I., Marzouk, B., & Ksouri, R. (2016). Effet de la provenance et du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes des graines de fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.) *Journal of New Sciences*. *J. New Sci.*, 27, 1478-1487.
- [22] KHENFER, S., & MEDJOUEL, M. (2016). Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques d'une plante médicinale de la région sud du Sahara Algérien (Doctoral dissertation, UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA).
- [23] Lucchesi, M. E. (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).
- [24] L.Singleton , R.Orthofer , R.M.Lamuela-Raventos, (1999)."Analysis of total phenols and otheroxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent" *Methods Enzymol.* , Vol. (299), page: 152.
- [25] Montreau, F. R. (1972). Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. *OENO One*, 6(4), 397-404.
- [26] Blouin, J., Llorca, L., Montreau, F. R., & Dufour, J. H. (1972). Etude des conditions optimales pour la détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu. *OENO One*, 6(4), 405-413.
- [27] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lwt-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- [28] Guelcin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., & Elias, R. (2004). Antioxidant Activity Of Saponins Isolated From Ivy: Alpha-Hederin, Hederasaponin-C, Hederacolchiside-E And Hederacolchiside-F. *Planta Medica*, 70(6), 561-563.
- [29] Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods Used to Evaluate The Free Radical Scavenging Activity In Foods And Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.
- [30] Selma, D., Imed, H., Saloua, F., Yassine, M., Hervé, C., Belgacem, H., Karim, H. (2012). Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *Journal of fonctionel foods*, 4: pp 423-432.

- [31] Popovici, C., Saykova, I. & Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel* 4 : pp 25-39.
- [32] Lavallaz, P., Délétroz, R. (1994). *Chromatographie*, pp 1-14. <http://www.etudiants.ch/upload/documents/superuser/chromatographie.pdf> Site acc é d é le 02/12/2015.
- [33] Ghnimi, W. (2015). Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées : Ricinus communis Ricinus et Jatropha curcas. Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l' activité de l' acetylcholinestérase. Thèse de Doctorat, Université de la Lorraine (France) et Université de Carthage (Tunisie). Pp 50, 51.
- [34] Panaiva, L. (2006). Les techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites. Conférence Eurocopter, pp 2-24.
- [35] Nicolaou, A.G.; Stavrou, I.J.; Louppis, A.P.; Constantinou, M.S.; Kapnissi-Christodoulou, C. (2021) "Application of an Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Method for the Detection and Quantification of Cannabis in Cerumen Samples". *J. Chromatogr. A*, 1642, 462035.
- [36] Pereira, O.R.; Catarino, M.D.; Afonso, A.F.; Silva, A.M.S.; Cardoso, S.M. (2018) "Salvia Elegans, Salvia Greggii and Salvia Officinalis Decoctions: Antioxidant Activities and Inhibition of Carbohydrate and Lipid Metabolic Enzymes". *Molecules*, 23, 3169.
- [37] Basli, A., Chibane, M., Madani, K., & Oukil, N. (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10(1), 2-9.
- [38] DERRICHE, A., ZERROUKI, F. Z., & ZERROUKI, M. (2018). Evaluation de l'effet antibactérien des composés phénoliques issus de *Curcuma longa* L (Doctoral dissertation, université ibn khaldoun-tiaret).
- [39] Boutlelis, D. A. (2014). Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar de Annaba, Département de Biologie).
- [40] Hafidi, G. (2008). Application de la commande prédictive non-linéaire à la commande de culture de bactéries *Escherichia coli* (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).
- [41] Pathanasophon, P., Sawada, T., Pramoolsinsap, T., & Tanticharoenyos, T. (1996). Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* broth culture bacterin and cell-free culture filtrate in ducks. *Avian Pathology*, 25(4), 705-719.

- [42] Chebaibi, A., Rhazi Filali, F., Amine, A., & Zerhouni, M. (2011). Effet bactéricide (in vitro) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum L.*) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 9(3), 158-164.
- [43] Malik, Z., Hanania, J., & Nitzan, Y. (1990). New trends in photobiology bactericidal effects of photoactivated porphyrins—An alternative approach to antimicrobial drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 5(3-4), 281-293.
- [44] Mezouar, D., Lahfa, F. B., Abdelouahid, D. E., Adida, H., Rahmoun, N. M., & Boucherit-Otmani, Z. (2014). Activité antimicrobienne d'extraits d'écorce de racines de *Berberis vulgaris*. *Phytothérapie*, 6(12), 380-385.
- [45] Amegawi, K. K., De Souza, C., Gbeassor, M., & Koumaglo, K. (1993). Etude de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux totaux de dix plantes médicinales. *Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines*, 109-115.
- [46] Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F., & Chefrou, A. (2016). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L.* de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85, 174-189.
- [47] Onzo, C. F., Azokpota, P., Dah-Nouvlessounon, D., Lehmane, T. H., Adjatin, A., & Baba-Moussa, L. (2015). Évaluation de l'activité antimicrobienne de quatre feuilles utilisées comme emballages dans l'artisanat agroalimentaire au Bénin. *Journal of Applied Biosciences*, 95, 9015-9027.
- [48] Guinoiseau, E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action (Doctoral dissertation, Université de Corse).
- [49] Elodie, G. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action (Doctoral dissertation, Thèse, Université de Corse-Pasquale Paoli, France, 143pp).
- [50] Bolou, G. E. K., Attioua, B., N'guessan, A. C., Coulibaly, A., N'guessan, J. D., & Djaman, A. J. (2011). Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la société royale des sciences de Liège*.
- [51] Fettah, A. (2019). Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique (antioxydante-antibactérienne) des extraits de la plante *Teucrium polium L.* sous espèce Thymoïdes de la région Beni Souik, Biskra (Doctoral dissertation, UNIVERSITE MOHAMED KHIDER BISKRA).

Chapitre II

Résultats & Discussions

II.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous explorons la famille des polyphénols, qui a suscité un intérêt considérable dans la recherche scientifique en raison de ses molécules naturelles à activité biologique élevée. Nous mettons en lumière les résultats de notre étude portant sur l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques, ainsi que la composition chimique des graines de *Nigella Sativa*. Pour ce faire, nous avons réalisé une analyse qualitative et quantitative à l'aide de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). En outre, nous examinons également l'activité biologique de ces composés.

II.2. Détermination du Rendement d'extraction

Les rendements d'extraction ont été déterminés en rapportant la quantité extraite par rapport au poids total de la poudre végétale. Ces rendements sont illustrés dans la figure II.01.

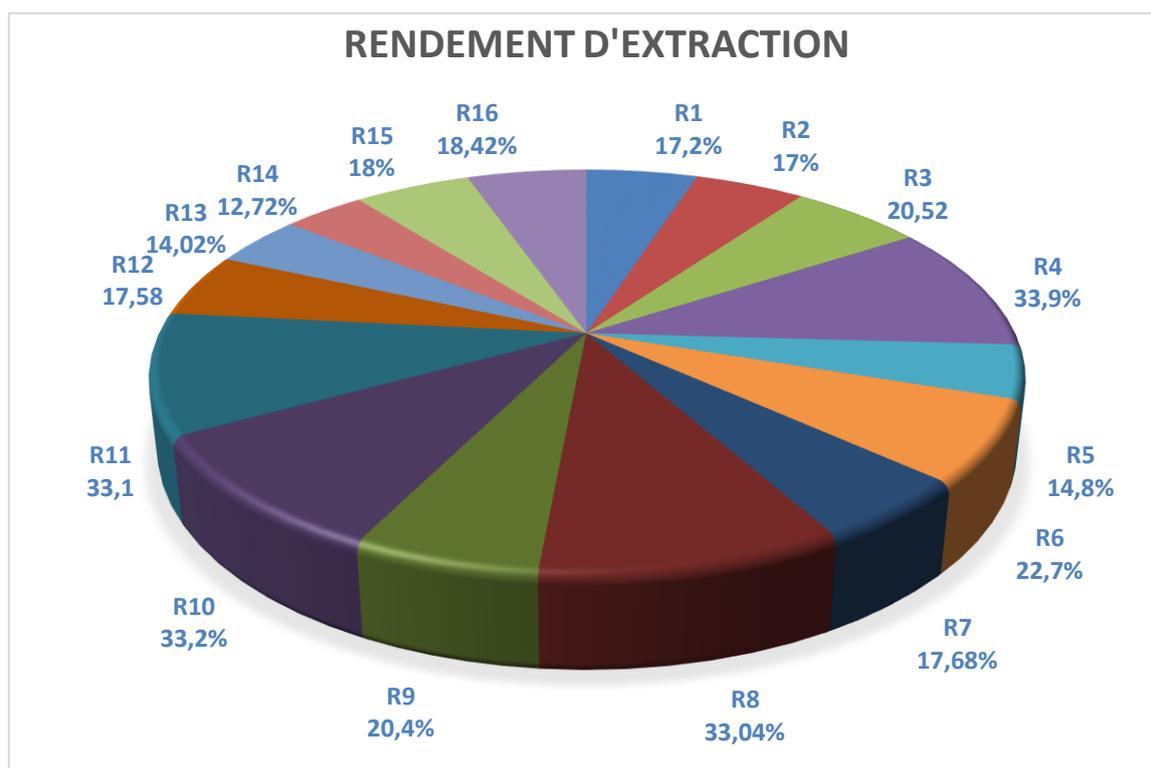


Figure II.01 : Le rendement d'extraction des différents extraits de *Nigella sativa L*

Les résultats obtenus pour les 16 extraits, montrent que le meilleur rendement est observé pour l'extrait R4, R8, R10 et R11, suivi par le R3, R6 et R9. Le plus faible rendement a été obtenu pour l'extrait R5, R13 et R14.

II.2.1. Influence du solvant sur le rendement d'extraction

Dans les études antérieures, divers solvants ont été utilisés pour extraire les composés phénoliques, souvent en combinaison avec de l'eau à des proportions variées [1,2]. En règle générale, les composés phénoliques présents dans les plantes sont de nature polaire et sont donc habituellement extraits à l'aide de solvants polaires [3].

Les polyphénols sont connus pour leur grande diversité, ce qui les rend pratiquement impossibles à extraire ou à fractionner de manière uniforme à l'aide d'une seule méthode [4]. Le choix du solvant pour extraire les composés phénoliques des matières végétales dépend de la nature de ces composés. En général, les solvants organiques sont les plus couramment utilisés pour l'extraction des divers constituants des plantes [5].

L'utilisation de combinaisons de solvants, tels que l'éthanol mélangé avec de l'eau, améliore l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques [6,7]. Un taux d'éthanol de 60% a présenté une efficacité maximale, conduisant à des niveaux élevés du rendement d'extraction. Les conditions optimales de l'effet de la concentration du solvant est présenté dans le tableau II.01.

Dans cette étude, l'éthanol est un solvant de polarité croissante couramment utilisé. Il présente l'avantage d'être plus facilement évaporé en cas d'une éventuelle concentration de l'extrait sous vide [8]. Le choix du solvant, en l'occurrence l'éthanol, joue un rôle crucial car différents solvants ont des affinités différentes avec les composés phénoliques. L'éthanol est un solvant de polarité intermédiaire, ce qui peut favoriser la solubilité d'une gamme de composés phénoliques. Cependant, la solubilité varie d'un composé à l'autre, ce qui peut influencer le rendement global de l'extraction [9].

II.2.2. Influence des ultrasons sur le rendement d'extraction

La différence du rendement lors de l'extraction par ultrasons avec de l'éthanol peut s'expliquer par plusieurs facteurs complexes. Tout d'abord, l'utilisation des ultrasons génère des ondes mécaniques à haute fréquence qui induisent des vibrations dans le solide ou le liquide, ce qui favorise la pénétration du solvant dans les matériaux cellulaires de la plante. Ces vibrations mécaniques peuvent perturber les parois cellulaires, facilitant la libération des composés phénoliques qui étaient piégés à l'intérieur. En conséquence, le transfert de masse est amélioré, ce qui peut entraîner un meilleur rendement d'extraction.

II.2.3. Influence de la température sur le rendement d'extraction

La température d'extraction joue un rôle crucial. Une augmentation de la température peut augmenter la solubilité des composés phénoliques, les rendant plus faciles à extraire. Cependant, il est essentiel de trouver un équilibre, car des températures excessivement élevées pourraient dégrader certains composés phénoliques sensibles à la chaleur.

À 50 °C, de nombreux solvants ont une capacité de dissolution optimale, ce qui favorise la solubilité des composés cibles. Cela peut conduire à un meilleur transfert des composés de la matrice d'origine vers le solvant. Ainsi pour une température modérée 50 °C la viscosité du solvant peut être suffisamment basse pour permettre une meilleure pénétration dans la matière végétale, améliorant le rendement d'extraction [8].

II.2.4. Influence du temps sur le rendement de l'extraction

Le temps d'extraction est un autre paramètre important. Une durée d'extraction plus longue permet aux ultrasons de travailler sur une plus grande période, offrant ainsi plus de temps pour que les composés phénoliques se libèrent des cellules végétales. Cela peut être particulièrement bénéfique pour les composés qui sont plus fortement retenus dans les tissus cellulaires.

Dans de nombreux cas, le processus d'extraction atteint un point de saturation au-delà duquel l'augmentation du temps n'entraîne pas une amélioration significative du rendement. Un temps d'extraction de 30 minutes peut être suffisant pour atteindre cette saturation, surtout si les composés sont rapidement solubles. Certains composés peuvent nécessiter un certain temps pour être libérés de la matrice végétale. Le temps d'extraction de 30 minutes peut être optimal pour assurer une libération efficace de ces composés sans prolonger excessivement le processus.

En résumé, la différence du rendement lors de l'extraction par ultrasons avec de l'éthanol résulte d'une combinaison de facteurs, notamment les effets mécaniques des ultrasons, la température, la durée d'extraction, le solvant et la distribution inégale des composés phénoliques dans la plante [10].

Tableau II.01 : Les conditions du rendement d'extraction.

Les conditions d'extraction			Rendement d'extraction (%)
Concentration d'éthanol (%)	Temps d'extraction (min)	Température d'extraction (°C)	
60	30	50	33,9%

II.3. Ajustement de la variance du modèle et analyse statistique

L'efficacité globale de l'extraction assistée par ultrasons (UAE) dépend de divers facteurs expérimentaux, tels que la température d'extraction, la durée et la concentration d'éthanol.

Les résultats de 16 essais expérimentaux menés selon le plan de Box-Behnken sont répertoriés dans le tableau II.02, fournissant les valeurs mesurées pour les deux paramètres de réponse, à savoir les composés phénoliques totaux (TPC) et l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH (Y_1 et Y_2) pour chaque essai.

Tableau II.02 : Matrice de conception de Box – Behnken avec variables codées et valeurs mesurées.

Test	Facteurs			Réponses	
	X1 (%)	X2 (°C)	X3 (min)	Y ₁ (mg GAE/g)	Y ₂ (%)
1	60	25	45	28.4	65.1
2	30	25	30	25.7	44.8
3	60	75	15	21.8	35.5
4	60	50	30	35.1	70.5
5	30	50	45	24.3	39.4
6	90	25	30	24.5	44.5
7	30	50	15	24.3	36.8
8	60	50	30	35.6	68
9	60	75	45	21.1	44.5
10	60	50	30	35.2	69.1
11	60	50	30	35.1	69
12	60	25	15	22.2	41.5
13	90	75	30	19.2	45.4
14	90	50	45	22.6	64
15	30	75	30	20.4	35
16	90	50	15	19.3	38.8

Il est communément admis que certaines variables, notamment la température de sonication, le temps et la concentration d'éthanol, exercent une influence significative sur la quantité totale de composés phénoliques récupérés ainsi que sur l'activité antioxydante de la matière végétale.

Les valeurs mesurées pour les composés phénoliques totaux (TPC) et l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH des graines de cumin noir varient respectivement de 19,2 à 35,6 mg d'équivalent d'acide gallique (GAE) par gramme et de 35 à 70,5 %. Ces fluctuations

soulignent clairement l'impact significatif des conditions d'extraction sur les rendements de ces paramètres. Ces résultats mettent également en évidence la grande sensibilité de la récupération des composés phénoliques aux conditions d'extraction, mettant ainsi en évidence la nécessité d'optimiser les paramètres de l'extraction par solvants pour obtenir une activité maximale de piégeage des radicaux libres DPPH et des composés phénoliques totaux à partir des graines de *Nigella Sativa* [11]. De plus, le tableau II.03 présente les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA), l'adéquation du modèle et les coefficients de régression.

Tableau II.03 : Analyse de la variance du modèle de régression pour le TPC et le DPPH*

Source	TPC			DPPH		
	Coefficient Estimate	F-Value	p-Value	Coefficient Estimate	F-Value	p-Value
Model	35.25	87.37	<0.0001	69.15	23.84	0.0005
X ₁ Ethanol con	-1.14	15.01	0.0082	4.59	12.75	0.0118
X ₂ Temperature	-2.29	60.71	0.0002	-4.44	11.93	0.0136
X ₃ Time	1.10	14.04	0.0095	7.55	34.53	0.0011
X ₁ X ₂	0.0000	0.0000	1.0000	2.67	2.17	0.1914
X ₁ X ₃	0.8250	3.95	0.0941	5.65	9.67	0.0209
X ₂ X ₃	-1.72	17.26	0.0060	-3.65	4.03	0.0913
X ₁ ²	-6.78	266.25	<0.0001	-14.31	62.04	0.0002
X ₂ ²	-6.02	210.57	<0.0001	-12.41	46.66	0.0005
X ₃ ²	-5.85	198.51	<0.0001	-10.09	30.82	0.0014
Lack of Fit	-	23.34	0.0140	-	24.00	0.0134
R ²	0.9924			0.9728		
Adjusted R ²	0.9811			0.9320		
C.V.%	3.20			7.16		
Adeq Precision	24.71			13.37		

Divers indicateurs statistiques ont été utilisés pour évaluer l'adéquation du modèle, y compris le coefficient de corrélation (R^2), $\text{adj-}R^2$ et le coefficient de variation (CV). Les valeurs de coefficient de corrélation (R^2) de l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH et (TPC) étaient de 0,992 et 0,972, respectivement.

La valeur R^2 a été utilisée pour juger de l'adéquation du modèle. Les modèles développés qui incluaient à la fois l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH et (TPC) avaient une valeur de p de 0,0001, ce qui signifie qu'ils étaient significatifs.

Les parcelles de diagnostic, figure II. 02 et figure II. 03 sont utilisées pour étudier la satisfaction du modèle et la relation entre les valeurs prédites et expérimentales.

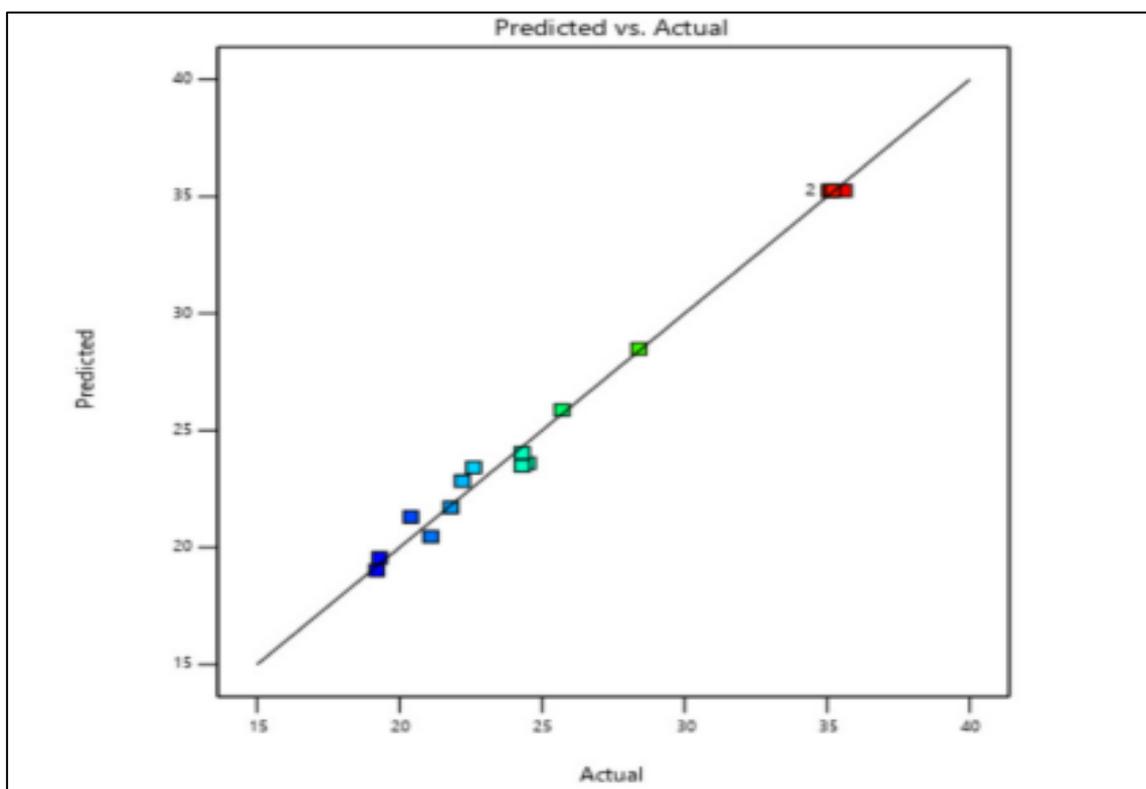


Figure II. 02 : Diagnostic des valeurs prédites et réelles pour le TPC

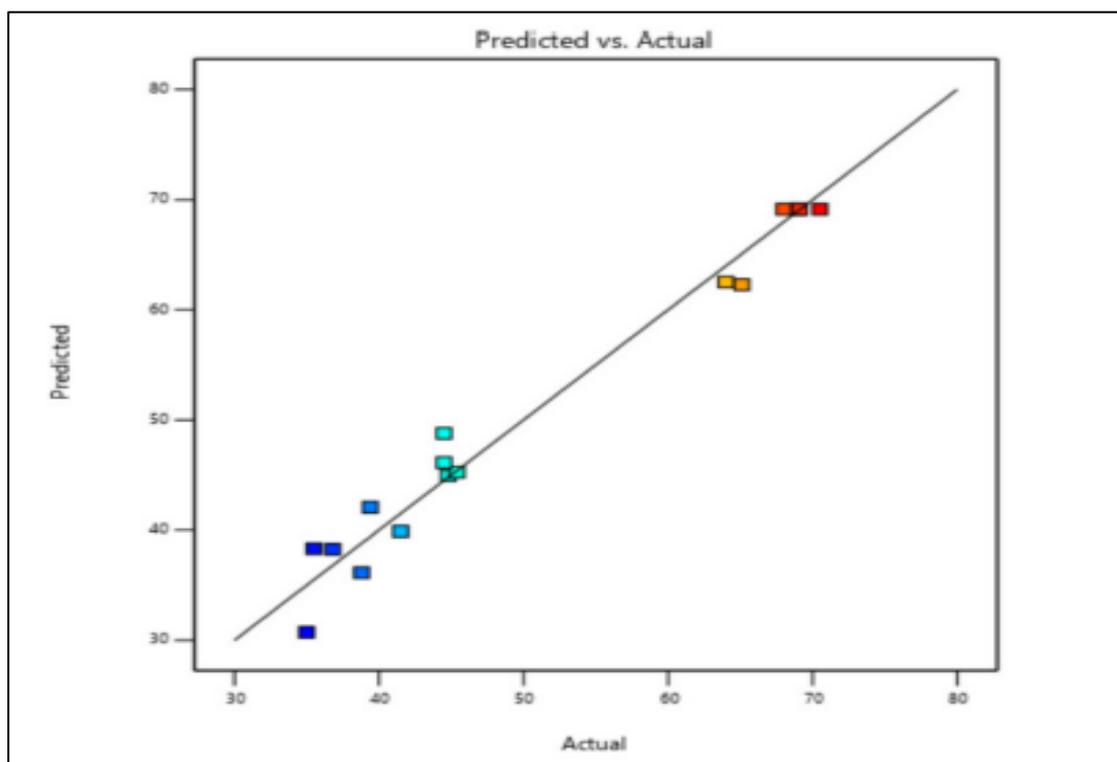


Figure II. 03 : Diagnostic des valeurs prédites et réelles pour le DPPH

Il ressort de la figure II. 02 et la figure II. 03 que les points de données sont très proches de la ligne droite avec un degré élevé de similitude. Une forte corrélation entre les données prédites et expérimentales reflète l'applicabilité et la précision du RSM pour l'optimisation du processus d'extraction. De plus, les valeurs adj-R2 (0,9811–0,9320) montrent que le modèle est significatif.

D'autre part, les faibles valeurs de (CV) 3,2 à 7,16 % indiquent que les valeurs sont très précises et fiables. Dans la plupart des cas, il est nécessaire de vérifier que le modèle ajusté donne une approche suffisante du système réel.

Les résultats ont démontré que les modèles utilisés dans cette recherche étaient adaptés et que les résultats de l'expérience étaient fiables et exacts pour la prédiction et l'optimisation des paramètres d'extraction assistée par ultrasons afin d'obtenir une activité de piégeage des radicaux libres DPPH et (TPC) plus élevée [12].

II.4. Etude de l'optimisation d'extraction des composés phénoliques

La méthode choisie pour évaluer la quantité de composés phénoliques dans les extraits de graines de *Nigella sativa* est le test des polyphénols totaux. Cette détermination a été réalisée en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible à double faisceau de type V-750 (Jasco, Tsukuba, Japon).

En employant la méthode à double faisceau, l'absorbance due au blanc est éliminée, permettant ainsi d'obtenir directement la densité optique de l'échantillon. Pour assurer la fiabilité des résultats, chaque dosage des composés phénoliques a été répété trois fois, et la moyenne des densités optiques mesurées a été calculée pour chaque composé phénolique.



Figure II.04 : Résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits de *N. sativa*

II.4.1. Analyse de la surface de réponse des polyphénols totaux (TPC)

Les polyphénols, en tant qu'antioxydants puissants, offrent une protection contre les dommages dus au stress oxydatif [13]. Leur utilisation s'étend au-delà de la simple modulation de ce stress, et ils sont intégrés dans des compléments nutritionnels, des additifs alimentaires fonctionnels et des produits pharmaceutiques visant à prévenir diverses maladies chroniques, notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2 et certains cancers [14].

Il est important de noter que la méthode d'extraction et les conditions d'extraction jouent un rôle essentiel dans l'obtention des composés extractibles ainsi que dans leurs

activités biologiques associées [15]. Les figures II. 05, II. 06 et II. 07 illustrent comment la température d'extraction, le temps d'extraction et la concentration du solvant influent sur le rendement des polyphénols totaux (tableau II.03).

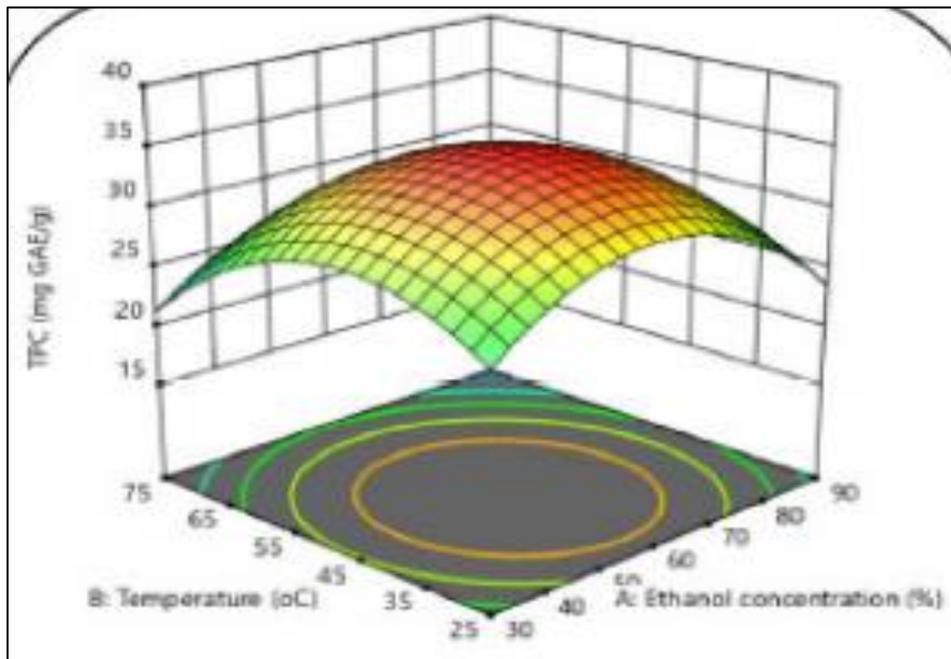


Figure II. 05 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et de la concentration du solvant sur les polyphénols totaux

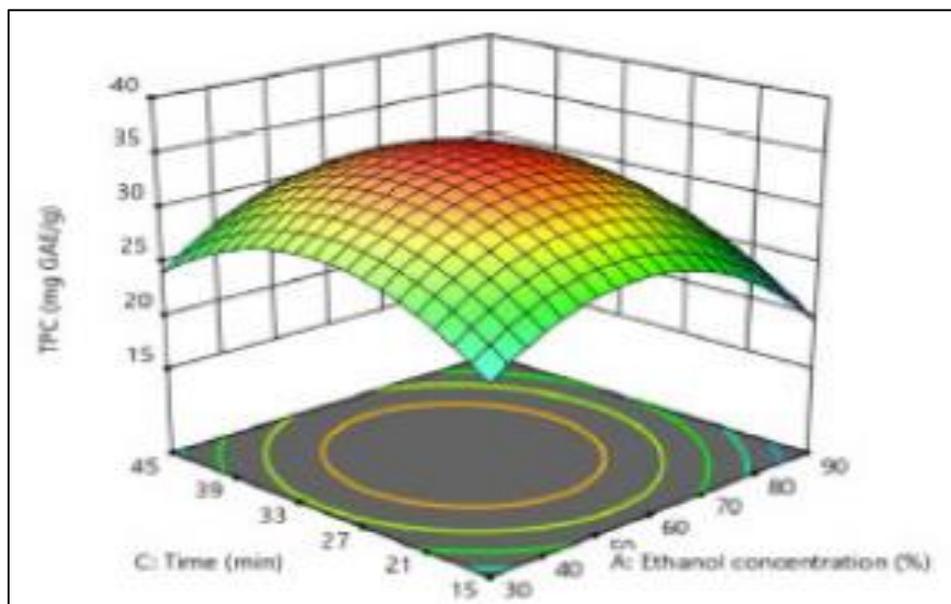


Figure II. 06 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet du temps d'extraction et de la concentration du solvant sur les polyphénols totaux

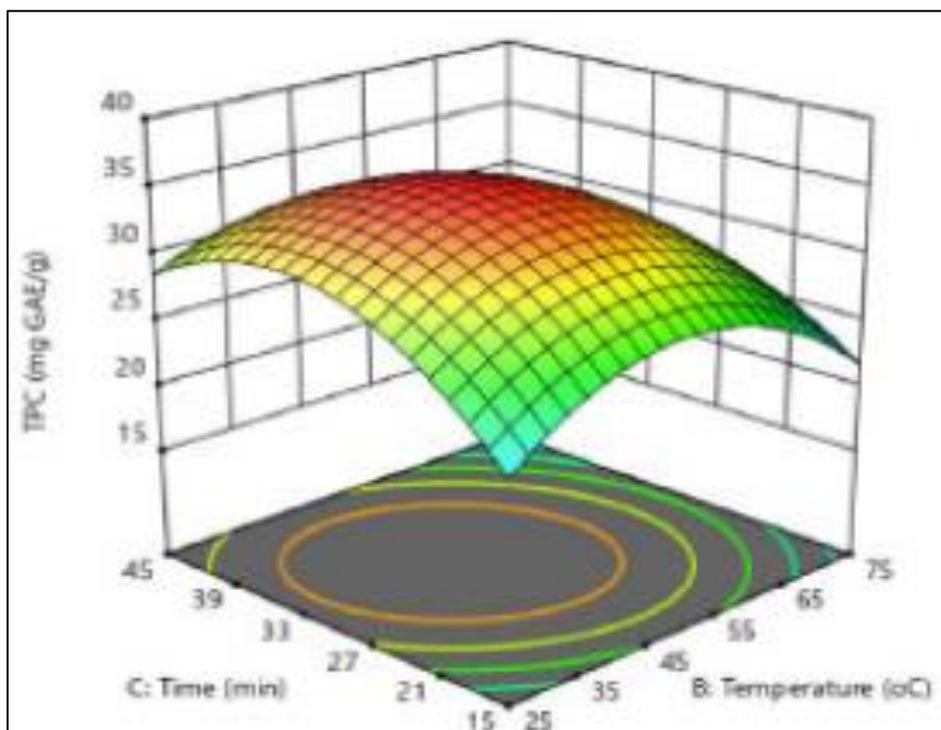


Figure II. 07 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet du temps d'extraction et de la température d'extraction sur les polyphénols totaux

II.4.2. Influence des variables d'extraction sur les polyphénols totaux

Les composés phénoliques exercent leur action antioxydante en chélatant les ions métalliques et en fournissant des atomes d'hydrogène ou des électrons pour neutraliser les radicaux libres. Cette capacité contribue à prévenir l'oxydation des produits alimentaires, notamment des huiles et des acides gras [16].

Les valeurs des données expérimentales ainsi que l'évaluation de l'impact des facteurs indépendants sur le (TPC) de l'extrait de *Nigella Sativa* sont présentées dans le tableau II.02.

Les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) ont indiqué que le modèle était adéquat pour évaluer le (TPC), avec un coefficient de détermination (R^2) de 0,9924 tableau II.03 [17]. Les niveaux de (TPC) déterminés expérimentalement dans les graines de *Nigella Sativa* variaient de 19,2 mg GAE/g à 35,6 mg GAE/g.

Les circonstances aux (EAU) de 60 % (concentration d'éthanol), 50 °C (température) et 30 min (durée) ont entraîné le (TPC) le plus élevé (35,6 mg GAE/g). Le (TPC) trouvé dans

les graines du cumin noir était supérieur à celles observées chez les espèces de solanum suivantes : Solanum ferrugineum (31,41 mg GAE/g), S. melongena (16,97 mg GAE/g) et S. betaceum (24,74 mg GAE/g) [18]. Cependant, il était inférieur à celui de Gandhi et al [19], valeur rapportée de 280 mg GAE/g dans l'extrait de S. torvum Swartz. Cela peut être causé par des variances régionales, la méthode d'extraction et les conditions utilisées.

L'équation polynomiale de second ordre suivante a été créée pour examiner l'impact de la variable indépendante sur l'extraction des (TPC) (équation 2.01).

$$Y_{\text{TPC}} = + 35.25 - 1.14X_1 - 2.29X_2 + 1.10X_3 - 1.72X_2X_3 - 6.78X_1^2 - 6.02X_2^2 - 5.85X_3^2$$

Equation II.01

Selon le tableau II. 03, la concentration d'éthanol (X_1), la température d'extraction (X_2) et le temps d'extraction (X_3) ont tous eu des effets significatifs sur la teneur phénolique totale des graines du cumin noir ($p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,01$, respectivement).

De plus, les impacts du quadratique (X_1^2 , X_2^2 et X_3^2) et l'interaction entre le temps d'extraction et la température (X_2X_3) ont eu un impact significatif ($p < 0,05$) sur l'UAE du (TPC) des extraits de cumin noir.

De plus, le rendement d'extraction de TPC à partir des graines du cumin noir n'a pas été affecté par les interactions entre la concentration d'éthanol et le temps et la concentration d'éthanol et la température ($p > 0,05$).

Comme le montre la figure II. 05, II. 06, le (TPC) s'améliore lorsque la concentration en éthanol augmente de 30 à 60 %. En revanche, lorsque la concentration en éthanol augmente à 90%, le TPC diminue régulièrement jusqu'à moins de 27 mg/g. Selon Gullon et al [20], ces effets résultent de la polarité du solvant ayant un impact sur l'extraction des phénoliques.

Ces auteurs ont également montré que le (TPC) de l'extrait de feuilles d'Eucalyptus globulus était affecté par une tendance similaire. De plus, lors de l'utilisation de l'extraction assistée par ultrasons, la concentration d'éthanol a eu un double impact similaire sur le (TPC) isolé de Zizyphus lotus tunisien fruits [21].

II.4.2.1. Effet du temps d'extraction sur les composés phénoliques totaux

La figure II. 05, II. 07, montre que le temps de sonication a le plus d'impact sur la récupération de TPC. Le temps d'extraction a été ajusté de 15 à 45 min pour démontrer comment il affectait l'efficacité du TPC.

Le TPC a augmenté lorsque le temps d'extraction a été porté à 30 min. Cependant, des temps plus longs impliquaient une diminution du TPC. Dans une étude similaire, Irakli et al [22] ont observé une augmentation du (TPC) dans les 30 premières minutes d'extraction par UAE puis une forte diminution du (TPC).

Le temps de sonication est divisé en deux étapes principales lorsque les métabolites secondaires sont extraits par les (EAU). La plupart des métabolites récupérés se produisent au cours de la « phase de lavage » initiale (20 à 30 min). Vient ensuite la « phase d'extraction lente » qui dure 60 à 100 min, lorsque les métabolites sont transportés par un processus de diffusion de la matrice vers le solvant [23].

Cette division en deux étapes de l'extraction pourrait expliquer les résultats obtenus, considérant que le processus de diffusion peut nuire au rendement d'extraction lorsque la plupart des composés phénoliques sont déjà extraits [24].

II.4.2.2. Effet de la température sur les composés phénoliques totaux

De plus, l'un des éléments clés aux (EAU) est la température de sonication. En général, une élévation de cette variable est corrélée à des augmentations des rendements d'extraction des composés phénoliques. Cela est dû à la rupture des liaisons matricielles, à l'augmentation du transfert de masse, de la solubilité chimique et de la vitesse de diffusion du solvant tout en diminuant la viscosité et la tension du solvant [25]. La température de sonication variait de 25 à 75 °C.

Les figures. II. 05, II. 07, ont montré que le rendement de l'extraction des composés phénoliques des graines de cumin noir augmentait nettement de 40 à 50 ° C. Le rendement en (TPC) le plus élevé (35,6 GAE/g dm) a été obtenu à 50°C, cette température étant choisie comme valeur optimale.

Du fait que les molécules de solvant se déplacent plus rapidement et facilement à des températures plus élevées, l'extraction des composés phénoliques augmente à mesure que la température d'extraction augmente [26]. Cependant, les composants sensibles à la chaleur

seront endommagés si la température d'extraction est trop élevée [27]. Cela pourrait expliquer pourquoi la teneur en (TPC) a chuté à des températures supérieures à 50 °C.

II.4.2.3. Effet de la concentration du solvant sur les composés phénoliques totaux

Les résultats de cette étude ont révélé que la concentration du solvant avait un effet significatif sur le rendement des composés phénoliques. En particulier, une concentration de 60 % d'éthanol a montré des performances optimales, aboutissant à des niveaux élevés de composés phénoliques totaux (TPC) extraits des graines de *Nigella sativa*.

Cela pourrait s'expliquer par l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans le solvant à cette concentration, favorisant ainsi leur libération et leur capture pendant le processus d'extraction [27].

L'effet de la concentration du solvant sur l'extraction des composés phénoliques a été cohérent avec les objectifs d'optimisation, visant à maximiser les (TPC). Les résultats ont démontré que la concentration du solvant était un paramètre critique à prendre en compte dans le processus d'EAU pour obtenir des extraits riches en composés phénoliques.

Il convient de noter que, bien que la concentration optimale du solvant a été déterminée à 60 % d'éthanol, d'autres paramètres, tels que la température, le temps d'extraction et la puissance ultrasonique, ont également joué un rôle essentiel dans l'optimisation du processus.

Ces résultats mettent en lumière l'importance de prendre en considération l'ensemble des paramètres d'extraction pour maximiser le rendement des composés phénoliques extraits des graines de *Nigella sativa* par EAU [26,27].

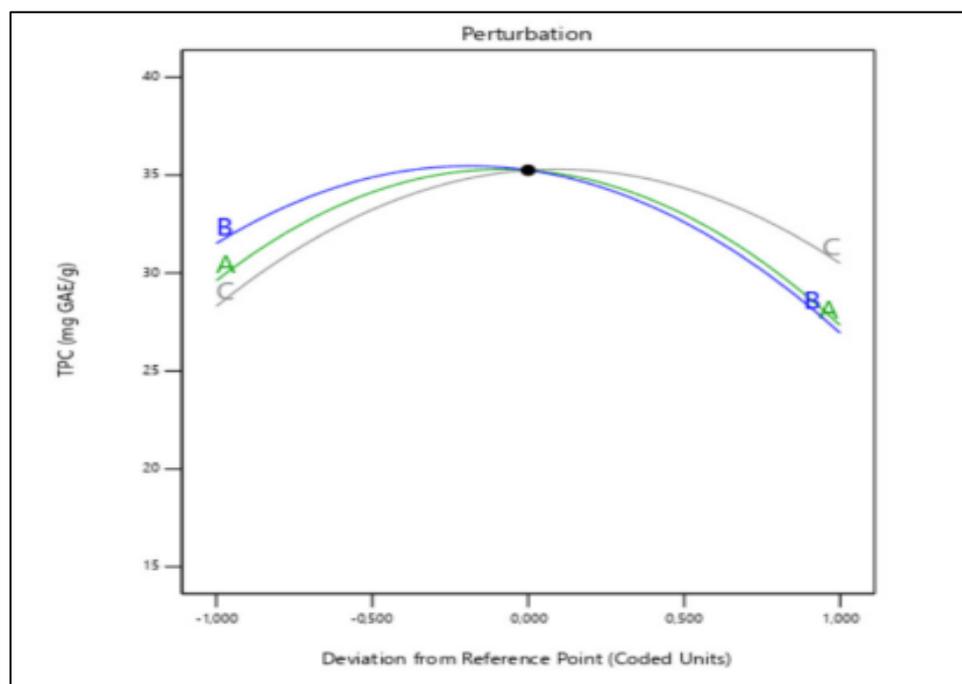


Figure II. 08 : Effet des facteurs d'extraction (A : concentration d'éthanol ; B : température ; C : temps d'extraction) sur les polyphénols totaux

II.4.3. Validation du modèle des polyphénols totaux

Les conditions optimales déduites du modèle étaient les suivantes : une durée d'extraction de 32,5 minutes, une température d'extraction de 44,6 °C et une concentration de solvant de 59,1 %. Selon ces paramètres, le modèle a prédit une teneur maximale de 36,1 mg GAE/g.

Pour confirmer et valider la prédiction du modèle mathématique, une nouvelle expérience a été réalisée dans les mêmes conditions optimales, obtenant ainsi une valeur mesurée de 35,6 mg GAE/g.

Tableau II. 04 : Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale de TPC

Les conditions optimales			Polyphénols totaux (mg GAE/g)	
Concentration d'éthanol (%)	Temps d'extraction (min)	Température d'extraction (°C)	Expérimental	Prédite
59.1	32.5	44.6	35.6	36.1

Cela indique que le modèle est bien adapté pour extraire les polyphénols totaux des graines de *Nigella Sativa* dans des conditions optimales et que le modèle est bien conçu pour prédire l'état d'extraction optimal.

II.5. Etude de l'optimisation de l'activité antioxydante

Diverses méthodes sont disponibles pour évaluer l'activité antioxydante in vitro en mesurant la capacité de piégeage des radicaux libres, notamment les radicaux peroxydes (ROO•) [28]. Parmi ces méthodes, on peut citer l'ORAC (Capacité d'absorption des radicaux oxygène), le TRAP (Paramètre antioxydant total de piégeage des radicaux), le FRAP (Pouvoir antioxydant réducteur ferrique) qui implique les ions ferriques [29]. Cependant, pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Nigella Sativa.L*, dans le cadre de cette étude, la méthode du DPPH• (2,20-diphényl-1-picrylhydrazyle) a été retenue.

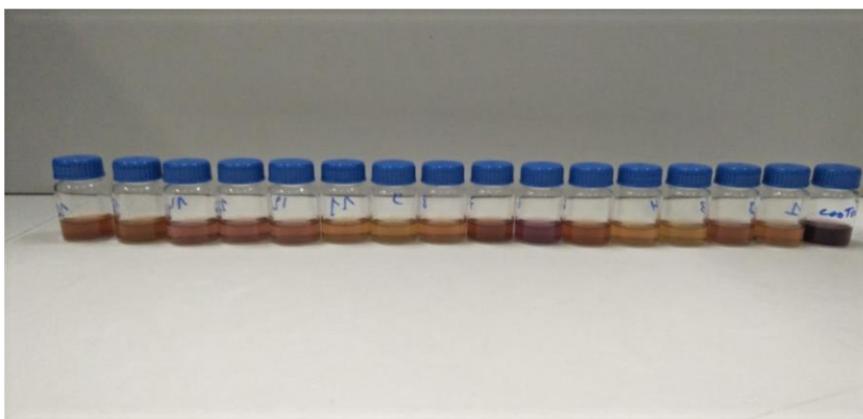


Figure II.09 : Résultats de l'activité antioxydante des extraits de *N. sativa*

II.5.1. Analyse de la surface de réponse du piégeage du radical DPPH

Les molécules antioxydantes sont définies par leur aptitude à entraver ou à ralentir l'oxydation, un processus chimique qui implique la perte d'électrons. Cette capacité est cruciale pour la protection des cellules contre les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont des radicaux libres [30].

Les figures II.10, II.11 et II.12, montrent l'effet de la température d'extraction, temps d'extraction et de la concentration du solvant sur le piégeage du radical libre DPPH (tableau II.03).

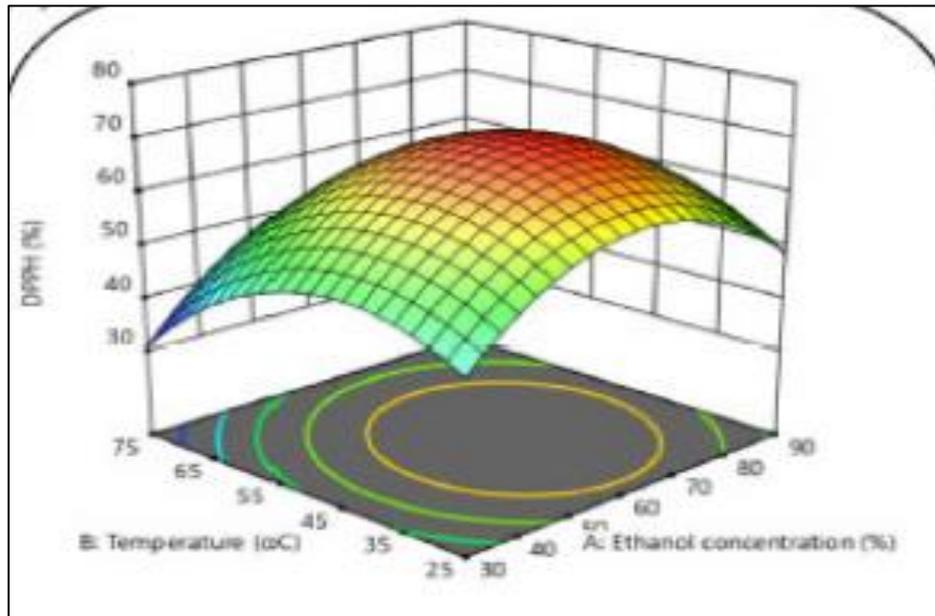


Figure II.10 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet de la température d'extraction et de la concentration du solvant sur le piégeage du radical DPPH

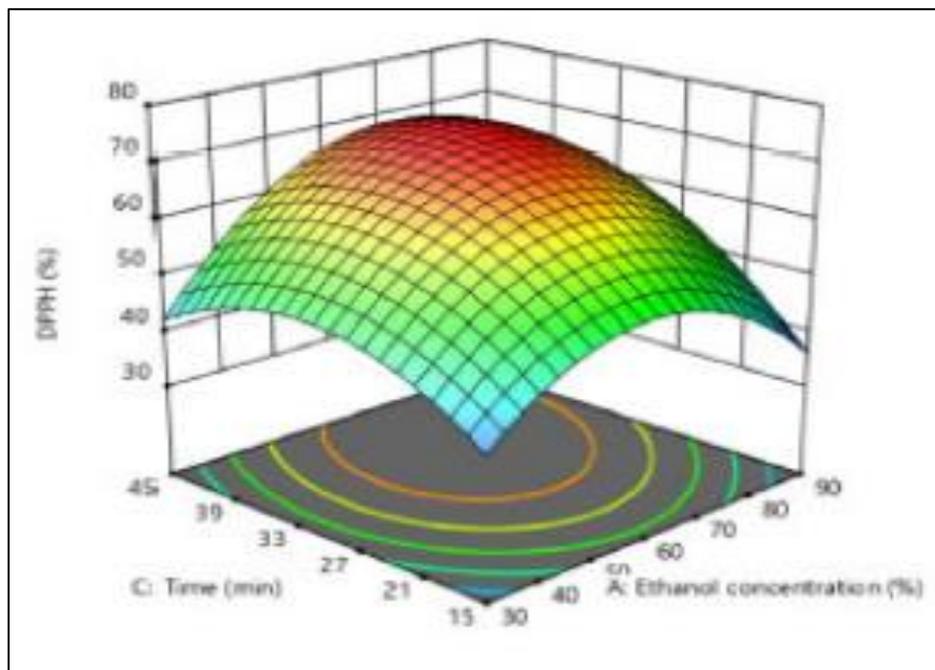


Figure II.11 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet du temps d'extraction et de la concentration du solvant sur le piégeage du radical DPPH

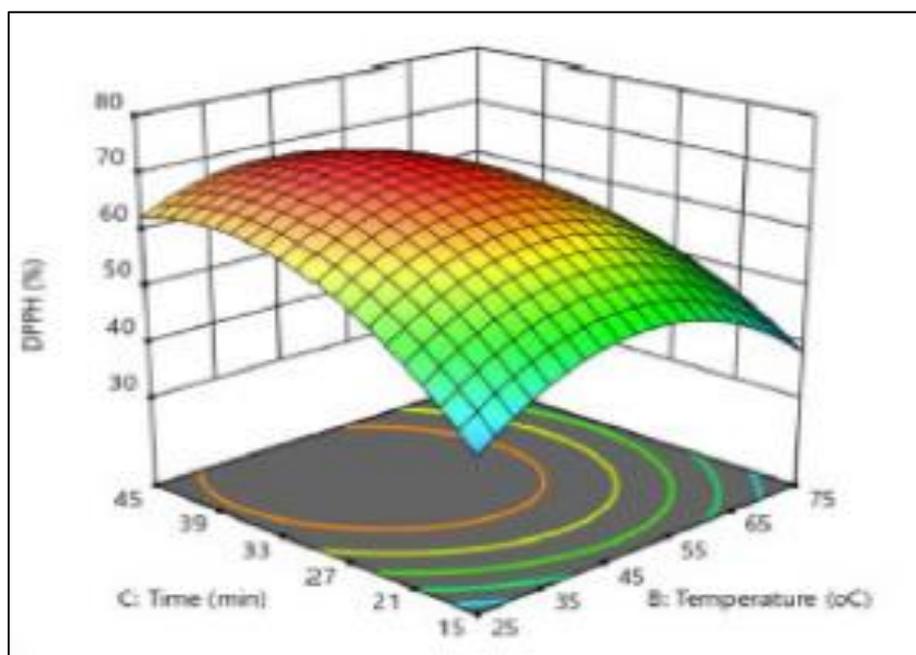


Figure II.12 : Diagramme 3D de surface de réponse montrant l'effet du temps d'extraction et de la température sur le piégeage du radical DPPH

II.5.2. Influence des variables d'extraction sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH

Selon Madhujith et Shahidi [31], les composés phénoliques produits à partir de sources végétales sont largement utilisés et importants en raison de leur capacité à servir d'agents réducteurs, de piègeurs de radicaux libres et de chélateurs d'ions métalliques pour réduire et contrôler le stress oxydatif.

La technique la plus courante pour l'évaluation de l'activité antioxydante dans les plantes est le dosage de l'activité de piégeage des radicaux DPPH. Pour cette raison, l'activité de piégeage des radicaux DPPH a été utilisée pour examiner le potentiel antioxydant des graines du cumin noir dégraissées. Comme on peut le voir dans le tableau II. 02, les extraits du cumin noir rapportent une activité antioxydante comprise entre 35 et 70,5 %.

Le pourcentage le plus élevé d'activité de piégeage des radicaux DPPH (70,5%) a été présenté dans l'extrait (R4) (tableau II.02), dans les conditions de concentration d'éthanol de 60%, de température de 50 °C et d'une durée de 30 min de sonication.

De plus, l'analyse de régression par ANOVA a révélé que le modèle choisi était très significatif puisque la valeur p était $<0,0001$ (tableau II.03). De plus, les coefficients du

modèle ont montré que tous les facteurs linéaires avaient un impact substantiel ($p < 0,01$ et $p < 0,001$) sur le résultat.

L'équation polynomiale suivante « équation II.02 » démontre la relation entre les facteurs de processus et l'activité antioxydante des composés extraits :

$$Y_{\text{DPPH}} = +69.15 + 12.75 X_1 + 11.93 X_2 + 34.53 X_3 + 9.67 X_1X_3 \\ + 4.03 X_2X_3 + 62.04 X_1^2 + 46.66 X_2^2 + 30.82 X_3^2$$

Equation II.02

Où, Y_{DPPH} représente la capacité de l'extrait des graines du cumin noir à piéger les radicaux DPPH, et X_1 , X_2 et X_3 représentent la concentration d'éthanol (%), la température (C) et le temps (min), respectivement.

Des parcelles de surface de réponse tridimensionnelle ont également été créées pour analyser les relations entre les données expérimentales des variables étudiées et l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH.

Les résultats ont démontré que les variables du processus d'extraction affectaient de manière significative l'activité de piégeage des radicaux DPPH figure II.10, II.11, et II.12.

Même si l'interaction entre la concentration d'éthanol et la température (X_1X_2) n'a eu aucun effet sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH, il a été prouvé que les interactions entre la concentration d'éthanol et le temps (X_1X_3) et entre la température et le temps (X_2X_3) avaient un impact significatif figure II.11, II.12.

Comme on peut le voir sur la figure II.13, la teneur en activité antioxydante de la résultante des extraits a augmenté significativement dans trois cas : lorsque la concentration en éthanol approche 60 %, lorsque la durée d'extraction est prolongée de 15 à 30 min, et lorsque la température est portée de 30 à 50 °C.

II.5.2.1. Effet des ultrasons sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH

Selon Fadimu et al [32], le procédé (UAE) favorise la dissolution des composés phénoliques à mesure que la concentration en éthanol augmente. Dans les combinaisons d'eau et d'éthanol, l'eau agit comme un agent gonflant, tandis que l'éthanol rompt les liens entre les solutés et la matrice cellulaire [33].

II.5.2.2. Effet de la concentration du solvant sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH

L'augmentation de la concentration en éthanol conduirait à l'extraction de plus de composés bioactifs à forte activité antioxydante. Cependant, même si une concentration d'éthanol de 60 % était la valeur optimale, l'activité de piégeage des radicaux DPPH a été rapidement abaissée à la valeur minimale de 35 % lorsque la concentration en éthanol a augmenté à 90 %.

Ce phénomène peut être causé par la faible solubilité des composés phénoliques dans l'éthanol, puisqu'il semble qu'une plus grande concentration de ce solvant n'est pas appropriée pour extraire des antioxydants plus puissants en raison de leur polarité. Les mêmes résultats ont également été observés dans une étude de Prasad et al [34], car les concentrations d'éthanol dépassaient 68 %.

II.5.2.3. Effet de la température sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH

Les études précédemment rapportées par Sahin et Samli et Tomsik et al [33,35], lorsque la température dépasse 60 °C, l'activité de piégeage des radicaux DPPH diminue. Cette réduction est une conséquence possible de la décomposition de certains composés phénoliques thermosensibles dans la matrice.

De plus, selon le temps de sonication, les résultats du (TPC) étaient alignés sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH, avec une valeur maximale à 30 min, puis diminuaient à un temps supérieur (45 min).

Ces conditions sont attendues car des températures de sonication plus élevées et des temps de sonication plus longs que les niveaux optimaux peuvent décomposer les composés phénoliques sensibles [36].

De plus, le dosage de l'activité de piégeage des radicaux DPPH a donné des résultats remarquablement comparables à ceux trouvés dans les études de recherche précédentes [36].

Étonnamment, la valeur de l'activité de piégeage des radicaux DPPH du cumin noir était significativement plus proche de celle de l'extrait d'épillets de palmier dattier (87,2%). Il a été obtenu dans des conditions optimales des (EAU) de 40,8 °C, 21,6 min et une concentration d'éthanol-eau de 50,0 %.

II.5.2.4. Effet du temps sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH

Les résultats de l'étude ont montré que le temps d'extraction avait un impact significatif sur l'activité antioxydante des extraits. Plus précisément, l'extraction pendant 30 minutes a conduit à la meilleure activité antioxydante, comparée aux extractions de 15 minutes et 45 minutes.

Cette observation suggère que l'activité antioxydante des extraits de *Nigella sativa* atteint son maximum à une durée d'extraction de 30 minutes [36]. Il est possible que l'extraction prolongée (45 minutes) ait entraîné une perte d'activité antioxydante due à la dégradation des composés phénoliques ou à d'autres facteurs indésirables. En revanche, une extraction plus courte (15 minutes) pourrait ne pas avoir suffisamment extrait les composés phénoliques responsables de l'activité antioxydante maximale.

Dans une autre étude, menée par Bouafia et al [37], les paramètres suivants de 38,9 min, 54,7 C et un rapport de 45,2 mL/0,5 g ont donné la capacité antioxydante la plus élevée pour le modèle UAE (42,17 mg AAE/g dm).

En résumé, les résultats indiquent que le temps d'extraction optimal pour maximiser l'activité antioxydante des graines de *Nigella sativa* par ultrasons est de 30 minutes. Cette découverte est importante pour l'optimisation du processus d'extraction, visant à obtenir des extraits riches en composés phénoliques aux propriétés antioxydantes bénéfiques pour la santé.

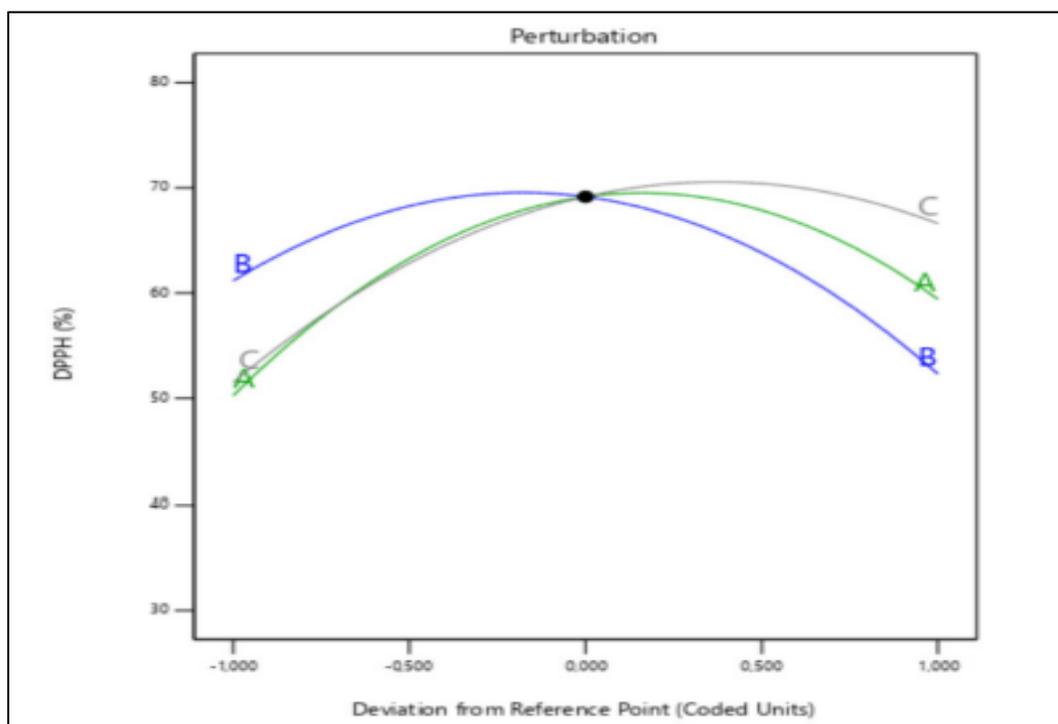


Figure II. 13 : Effet des facteurs d'extraction (A : concentration d'éthanol ; B : température ; C : temps d'extraction) sur le DPPH

II.5.3. Validation du modèle de DPPH

Les conditions idéales, déterminées à l'aide du modèle, se sont avérées être les suivantes : un temps d'extraction de 32,5 minutes, une température d'extraction de 44,6 °C et une concentration de solvant de 59,1 %. Selon les prévisions du modèle, ces paramètres devaient conduire à un rendement maximal de 69,2 %. Pour confirmer la validité du modèle mathématique prédit, une nouvelle série d'expériences a été menée dans ces mêmes conditions optimales, et le résultat obtenu s'est élevé à 70,5 %.

Tableau II. 05 : Conditions optimales, valeur prédite et expérimentale de DPPH

Les conditions optimales			DPPH %	
Concentration d'éthanol (%)	Temps d'extraction (min)	Température d'extraction (°C)	Expérimental	Prédite
59.1	32.5	44.6	70.5	69.2

Cela indique que le modèle est bien adapté pour le piégeage du radical DPPH des graines du cumin noir dans des conditions optimales et que le modèle est bien conçu pour prédire l'état d'extraction optimal.

II.6. Analyse des conditions d'extraction conventionnelle

Tableau II. 06 : Conditions optimales d'extraction conventionnelle de (TPC) et le DPPH.

Les conditions optimales			TPC (mg GAE/g)	DPPH (%)
Concentration d'éthanol (%)	Temps d'extraction (min)	Température d'extraction (°C)		
50	120	50	20.9	51.1

Les graines de *Nigella Sativa.L* ont affiché des valeurs de 20,9 mg GAE/g pour les composés phénoliques totaux (TPC) et de 51,1 % pour l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH.

Ces résultats suggèrent que les conditions d'extraction n'ont pas eu un impact significatif sur les rendements de ces paramètres.

Cependant, il est important de noter que les composés phénoliques extraits restent sensibles aux conditions de l'extraction conventionnelle. Cela souligne la nécessité de rechercher l'optimisation des paramètres, tels que la composition du solvant et la durée de l'extraction, pour maximiser à la fois l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH et le contenu en composés phénoliques totaux (TPC) des graines de *Nigella Sativa* [38].

L'extraction des composés phénoliques à partir des plantes est un processus complexe influencé par plusieurs facteurs, dont la nature chimique des composés, la méthode d'extraction choisie, la durée de l'extraction, les conditions de stockage, et la présence de substances interférentes.

Différents solvants, tels que l'éthanol, l'acétone, le propanol, l'acétate d'éthyle, et même l'eau, sont couramment utilisés pour cette tâche [39].

L'utilisation d'une méthode d'extraction à température ambiante présente l'avantage d'extraire un maximum de composés tout en minimisant le risque de dénaturation ou de

modification de ces composés. En comparaison avec d'autres méthodes qui utilisent des températures élevées, l'extraction à température ambiante permet de préserver l'intégrité des composés phénoliques [40].

II.7. Conditions optimisées et comparaison avec la technique conventionnelle

A partir de la base des données expérimentales et prédites, les conditions optimales d'extraction assistée par ultrason (EAU) étaient comme suit : concentration d'éthanol de 59,1 %, une température d'extraction de 44,6 C et une durée d'extraction de 32,5 min. Dans ces conditions, les activités de piégeage des radicaux libres DPPH et (TPC) ont été 70,5 % et 35,6 (mg GAE/g), respectivement.

En comparaison avec la méthode conventionnelle, les activités de piégeage des radicaux libres DPPH et (TPC) dans les conditions optimales des (EAU) ont augmenté d'environ 51,1 % et 20,9 (mg GAE/g) [62], respectivement tableau II.07.

Le résultat a révélé que l'utilisation de (EAU) a un effet bénéfique sur l'extraction des composés bioactifs des graines de *Nigella sativa*, puisqu'il est supérieur à celui obtenu par les techniques conventionnelles [41].

Ces résultats s'expliquent principalement par la capacité de l'extraction par ultrasons à favoriser le transfert de masse et à accélérer la procédure d'extraction, améliorant ainsi l'extraction des composés bioactifs.

De plus, les (EAU) offraient un processus d'extraction plus rapide, plus productif et à basse température pour la récupération des composés phénoliques des graines de cumin noir dégraissées.

Tableau II.07 : Comparaison des conditions d'extraction, TPC et DPPH de chaque technique.

Méthodes	Concentration d'éthanol (%)	Température (°C)	Temps (min)	TPC (mg GAE/g)	DPPH (%)
Non-conventionnelle	59,1	44,6	32 ,5	35,6	70,5
Conventionnelle	50	50	120	20,9	51,1

II.8. Analyse chromatographique des composés phénoliques par HPLC

II.8.1. Chromatogramme des étalons

Les figures II. 14 et II. 15 montrent les profils des chromatogrammes des mélange d'étalons utilisés pour les deux extraits testés obtenus par extraction conventionnelle et non-conventionnelle.

Ces analyses sont enregistrées à longueur d'onde 280 nm. Le mélange est composé d'une solution qui contient six étalons : Acide gallique, catéchine, épicatechine, acide caféique, rutine et quercétine.

L'identification puis la quantification des composés phénoliques présents dans les extraits testés sont faites par comparaison de leurs temps de rétention et des surfaces des pics obtenus avec ceux des étalons.

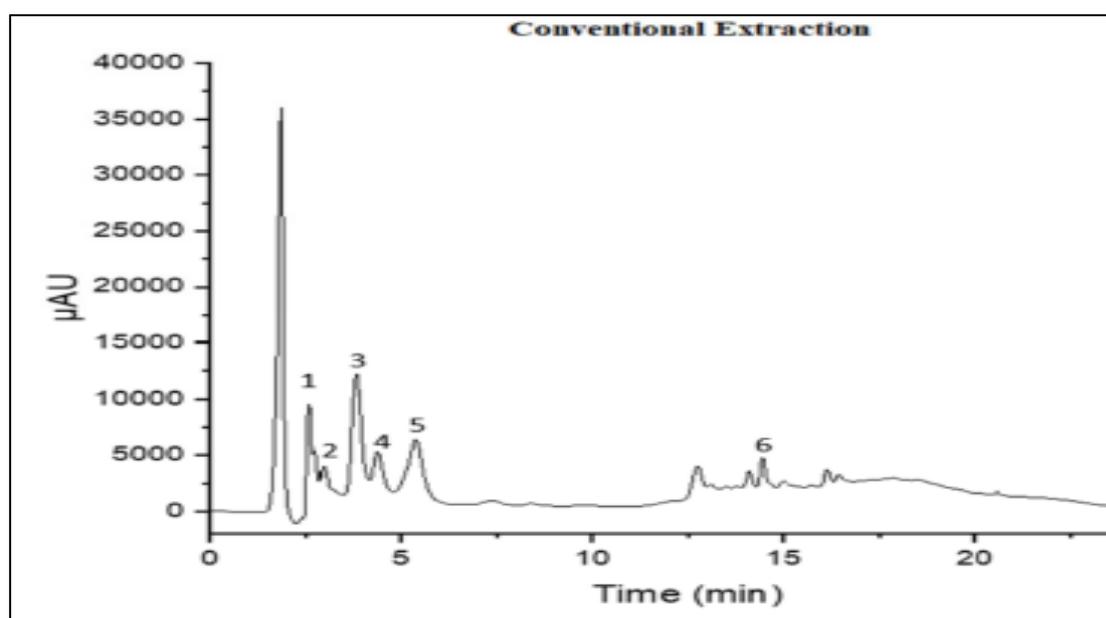


Figure II.14 : Profil du chromatogramme du mélange des étalons pour l'extraction conventionnelle

- (1) Acide gallique, (2) catéchine, (3) épicatechine, (4) acide caféique, (5) rutine, (6) quercétine

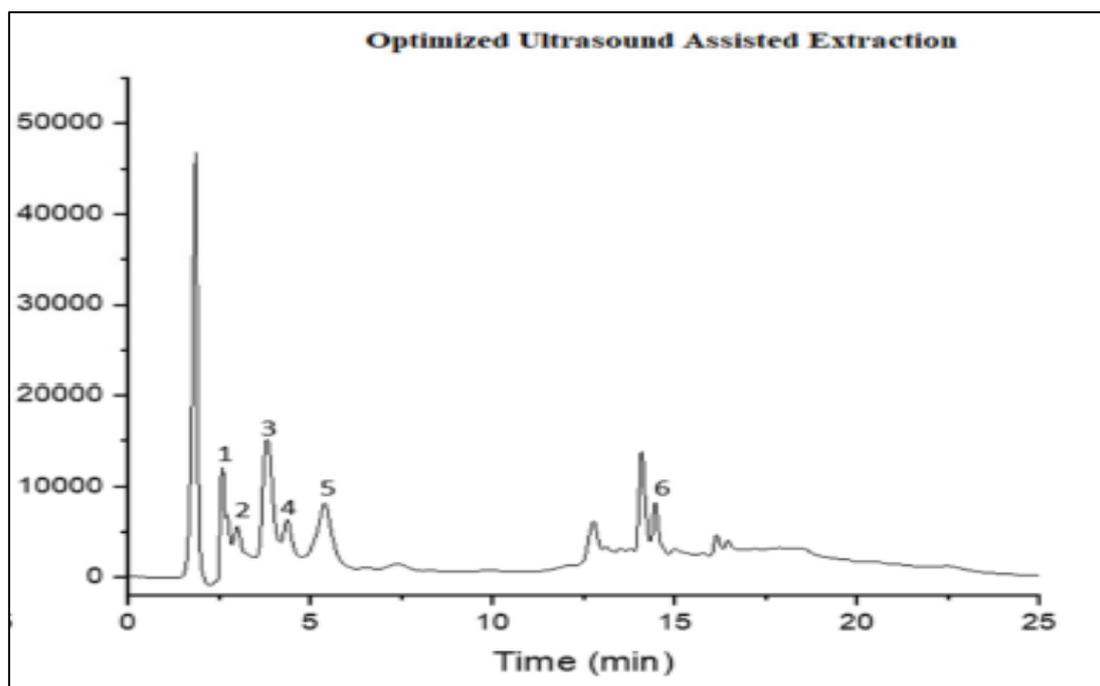


Figure II.15 : Profil du chromatogramme du mélange des étalons pour l'extraction assistée par ultrasons

(1) Acide gallique, (2) catéchine, (3) épicatechine, (4) acide caféique, (5) rutine, (6) quercétine

Le tableau II. 08 résume le temps de rétention, coefficient de corrélation, les équations de régression, limites de détection et de quantification et la répétabilité et la reproductibilité (n= 3).

Tableau II.08 : Le temps de rétention, coefficient de corrélation, limites de détection et de quantification et les équations de régression (n=3)

Composés	Rt ± SD	Equation linéaire	R ²	LOD (μ g/mL)	LOQ (μ g/mL)	Intraday RSD _{Area} %	Interday RSD _{Area} %
Gallic Acid	2.52 ± 0.00	Y = 84073550x + 1060	0.998	0.3	0.9	1.00	0.92
Catechin	3.34 ± 0.02	Y = 13269933x - 2012	0.999	0.3	0.9	0.95	2.53
Epicatechin	3.83 ± 0.03	Y = 16600346x + 2404	0.998	0.3	0.8	1.04	1.47
Caffeic Acid	4.54 ± 0.05	Y = 55118151x + 8713	0.997	0.3	1.0	0.47	1.96
Rutin	5.54 ± 0.07	Y = 23176073x - 1269	0.998	0.9	2.8	0.55	1.80
Sinapic Acid	7.99 ± 0.06	Y = 39382578x + 2882	0.997	0.4	1.1	0.33	1.92
Quercitrin	11.49 ± 0.08	Y = 12295377x - 1169	0.999	0.1	0.3	0.42	1.84
Myricetin	13.12 ± 0.03	Y = 25427092x + 2679	0.998	0.3	0.9	0.90	2.68
Quercetin	14.67 ± 0.04	Y = 3406370x + 42715	0.998	0.3	0.9	0.32	1.67

II.8.2. Identification et quantification des composés phénoliques

Concernant nos résultats, les équations de régression obtenues ont révélé une relation linéaire entre la surface du pic de chaque composé polyphénoliques et leur concentration, avec des coefficients de corrélation correspondants supérieurs à 0,995. Dans l'intervalle, les valeurs RSD% des dosages intra et interjournalière étaient respectivement comprises entre 0,32 et 1,04 et 0,92 et 2,68. Les limites de détection et de quantification se situaient respectivement entre 0,1 et 0,9 et 0,3 et 2,8 g/mL, comme illustré dans le tableau II. 08.

L'analyse HPLC-UV actuelle a examiné l'existence possible de neuf polyphénols majeurs aux extraits conventionnel et non-conventionnel du cumin noir. Tous les résultats des

polyphénols détectés sont exprimés en concentration moyenne (mg/g d'extrait sec) écart type tableau II. 09.

Selon nos découvertes, six polyphénols étaient présents dans l'extrait conventionnel, mais seulement quatre étaient au-dessus de la limite de quantification. Les concentrations de catéchine, d'épicatéchine, d'acide caféique et de rutine dans l'extrait étaient respectivement de 0,18, 1,88, 0,17 et 0,96 mg/g.

En revanche, dans le cas de l'extrait non conventionnel, la quantification était possible pour cinq composés, tandis que l'acide gallique était également inférieur à la LOQ. De plus, les teneurs en catéchine, épicatechine, rutine et quercétin étaient respectivement de 0,27, 2,37, 1,21 mg/g et 0,15 mg/g.

Cependant, la concentration d'acide caféique dans l'extrait conventionnel présentait le même niveau que l'échantillon de l'extrait non-conventionnel (0,17 mg/g), comme indiqué à la figure II. 14, II. 15 et tableau II. 09

Tableau II.09 : Concentration des composés phénoliques détectés dans les graines de *Nigella Sativa.L*

Composé phénolique	Technique conventionnelle (mg/g)	Technique non-conventionnelle (mg/g)
Gallic Acid	NQ	NQ
Catechin	0.18 ± 0.00	0.27 ± 0.00
Epicatechin	1.88 ± 0.00	2.37 ± 0.02
Caffeic Acid	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.00
Rutin	0.96 ± 0.00	1.21 ± 0.01
Sinapic Acid	ND	ND
Quercitrin	ND	ND
Myricetin	ND	ND
Quercetin	NQ	0.15 ± 0.00

ND : non détecté.

NQ : non quantifié

II.8.3. Analyse du profil phénolique

Contrairement à une étude publiée précédemment [42] sur la caractérisation des acides phénoliques et des flavonoïdes extraits du cumin noir, la quantification était possible pour six composés. L'acide protocatéchuique, l'acide caféique, l'acide ellagique, l'acide férulique, la quercétine, le kaempférol et l'acide gallique ont tous été mesurés à 0,13, 0,50, 0,15, 0,37 et 0,15 mg/g, respectivement.

Dans une autre étude, par Saleha. H et al [43], l'analyse HPLC des graines du cumin noir a révélé la présence d'acide chlorogénique, d'acide caféique, de kaempférol et de thymoquinone à des concentrations de 5,5, 4,09, 6,02 et 5,13 g/g, respectivement.

De plus, notre preuve que des substances telles que la rutine, l'acide gallique et l'acide caféique sont présents dans les graines du cumin noir, s'alignent également sur les résultats d'une enquête menée par Muzolf et al [44].

Ainsi, une étude plus récente menée en 2020 par Feng et al [45], à l'aide d'un système LC-ESI-QTOF/MS a identifié et quantifié sept composés bioactifs, dont le kaempférol-3-glucoside, la diosmine, la quercétine, le kaempférol, l'acide protocatéchuique, l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide chlorogénique, à des concentrations de 0,39, 0,21, 1,83, 9,8, 1,39, 22,86 et 0,02 mg/g, respectivement.

Des études antérieures ont indiqué que l'acide gallique, l'acide caféique, la quercétine et le kaempférol sont les composés les plus répandus dans les graines de *Nigella Sativa*.

D'après nos résultats, la concentration en acide caféique était de 0,17 mg/g dans les deux extraits secs. L'acide gallique a été présenté dans les deux extraits à des concentrations très faibles, inférieures à la limite de quantification, tandis que la quercétine a été trouvée dans l'extrait non-conventionnel seulement et le kaempférol n'a pas été détecté. L'épicatéchine était le principal composé phénolique dans les deux extraits.

II.9. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait de *N. sativa*

L'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique obtenu a été évaluée qualitativement à l'aide de la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques et méthode des puits). Cette approche a permis de mettre en évidence leur capacité à inhiber la croissance des souches bactériennes utilisées « *Escherichia coli* et *staphylococcus aureus* », qui proviennent de la collection du laboratoire de recherche de bioconversion génie microbiologique et sécurité sanitaire (LBGMSS) de l'Université Mustapha Stambouli de Mascara. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) a été utilisé comme témoin négatif dans l'étude. Ainsi, afin de définir le caractère bactériostatique de l'extrait des graines de *N. Sativa*, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminé vis-à-vis les deux souches par la méthode de microdilution [46].

II.9.1. Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'extrait de *N. Sativa* par l'aromatogramme

La détermination de l'activité antimicrobienne de l'extrait de la plante étudiée est effectuée par la méthode des disques et des puits (aromatogrammes). L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée vis-à-vis les deux souches « *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ». L'activité inhibitrice de l'extrait a été étudiée dans une large gamme de concentrations allant de 25 à 200 mg/mL.

Les résultats obtenus sont exprimés en diamètres des zones d'inhibition (mm) qui permet une estimation du caractère de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne vis-à-vis des extraits testés.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés par un pied à coulisse en mm. Les résultats sont obtenus après 24h d'incubation à 37 °C. Les résultats de cette partie sont regroupés dans le Tableau II.10, figure II. 16 et II. 17.

La sensibilité d'un extrait a été classée par le diamètre des halos d'inhibition : non sensible (-) pour les diamètres de moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres de plus de 20 mm [47]. Le tableau II.10 montre l'effet antibactérien avec les diamètres d'inhibition des extraits de la plante étudiée.

Tableau II.10 : Diamètre d'inhibition de l'extrait sur les souches bactérienne testée

Concentration de l'extrait (mg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm) des extraits	
	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>
200	8	-
150	6	-
100	-	-
50	-	-
25	-	-

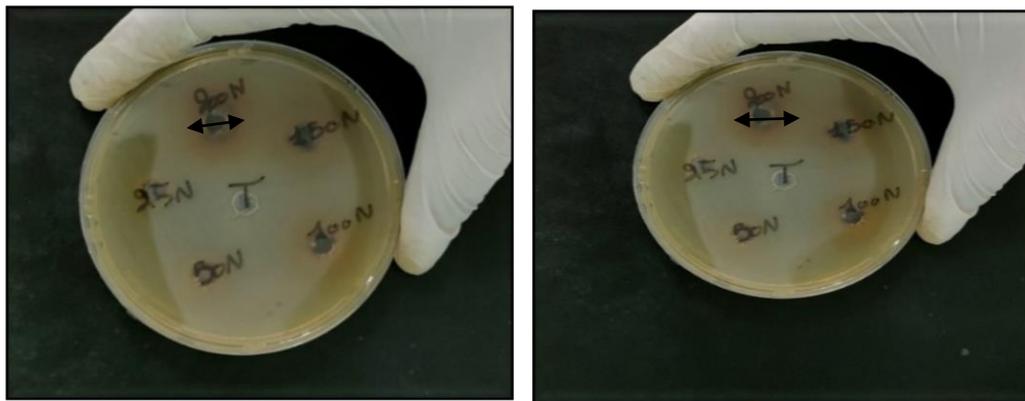


Figure II.16 : Pouvoir antimicrobien de l'extrait éthanolique de *N. sativa* vis-à-vis « *Escherichia coli* » par la méthode des puits

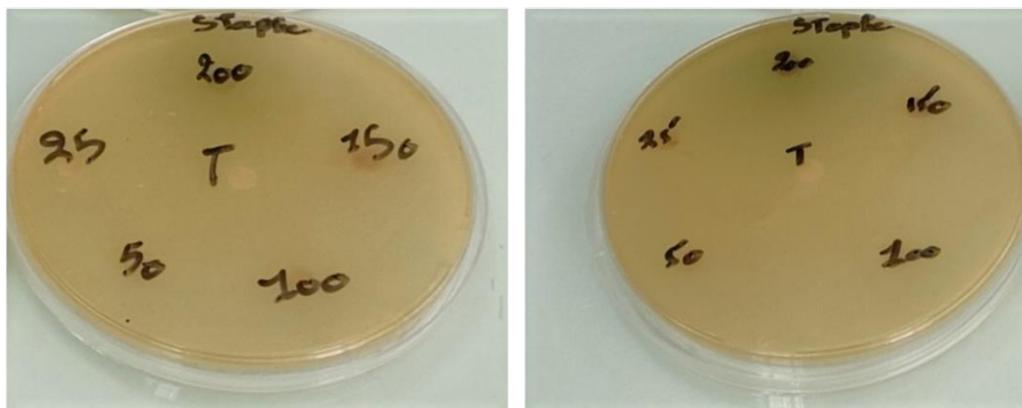


Figure II.17 : pouvoir antimicrobien de l'extrait éthanolique de *N. sativa* vis-à-vis « *Staphylococcus aureus* » par la méthode de disques

Les résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion montrent une résistance remarquable des souches testées. Nos extraits sont en majorité non sensible (diamètre de la zone d'inhibition moins de 8mm). Les résultats présentés dans le Tableau II.09 montrent que l'extraits éthanolique (R4) possède une activités antibactériennes faible contre les deux souches bactériennes mises en expérimentation.

La faible activité de cet extrait peut être expliquée par la faible capacité de se diffuser de manière uniforme à travers l'agar [48]. En effet, la souche à gram négatif *Escherichia coli* révèle un diamètre d'inhibition de 8 mm pour une concentration de 200 mg/mL. On peut expliquer ces résultats par la teneur et la nature des composés phénoliques répartis de manière différentielle dans les extraits naturels ainsi selon les solvants utilisés [49]. Plusieurs études antérieures portant sur l'activité antibactérienne des extraits de plantes ont confirmé que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux extraits végétaux, tandis que les Grams négatifs sont moins sensibles [50] mais concernant notre test, cette activité n'était pas clairement visible.

La grande résistance des bactéries Gram négatif est liée en partie à la complexité de leur paroi cellulaire qui contient une double membrane. Celle des bactéries Gram positif est relativement simple [51].

Les bactéries gram-négatives sont plus résistantes aux composés phénoliques. Ceci est probablement lié à la présence d'une membrane externe lipophile contenant des niveaux élevés de phospholipides. Ce site rend la paroi cellulaire imperméable à plusieurs macromolécules et restreint la diffusion des composés hydrophobes à travers son enveloppe lipopolysaccharidique.

La résistance élevée des bactéries Gram-négatives aux composés phénoliques peut également être associée à la présence d'enzymes dans l'espace périplasmique, qui peuvent endommager les molécules introduites de l'extérieur. Par conséquent, la différence structurelle des bactéries joue un rôle important dans leur sensibilité [51,52].

À la lumière de ces résultats, on peut déduire que l'activité antibactérienne des extraits est variable d'une étude à une autre, rendant la comparaison des résultats difficile. Ceci peut être justifié par l'influence de plusieurs paramètres tel que la méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne ou la charge du disque [52,53]. En plus, du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants phénoliques, il est probable que l'activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire [54].

II.9.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de microdilution

L'interaction d'une bactérie et d'un extrait selon le temps d'exposition et la concentration de l'extrait se traduit soit par une inhibition ou un ralentissement de la croissance (bactériostase), soit par une destruction de la bactérie (bactéricidie).

L'activité inhibitrice de l'extrait a été testée dans une large gamme de concentrations allant de 0.07 à 150 mg/mL.

La concentration minimale inhibitrice ou CMI définie en milieu liquide, qui explore la bactériostase, correspond à la plus faible concentration d'extrait (habituellement exprimée en mg/L) inhibant toute croissance bactérienne visible macroscopiquement. Cette CMI peut également être déterminée en milieu solide [55].

Les résultats de l'extrait éthanolique de *N. Sativa* vis-à-vis les deux souches microbiennes testées *E. coli* et *S. aureus* sont représentés ci-dessous dans la figure II.18, II.19.

D'après les résultats obtenus (figure II.18), l'extrait éthanolique de *N. sativa* possède une activité bactéricide spécifique contre *Escherichia coli*. Pour les concentrations inférieures à 18.75 mg/ml, l'extrait n'a aucune activité sur la croissance de *Escherichia coli*. Pour la concentration 37.5 mg/ml, l'activité bactéricide est diminuée pendant les deux premières heures d'incubation et l'extrait a empêché la croissance de la souche microbienne par rapport au témoin (T). Alors que la concentration 75 mg/ml, est la plus faible concentration bactéricide (CMB) contre *Escherichia coli*. Pendant 72 heures d'incubation. Les résultats ont révélé l'effet très remarquable de la concentration 150mg/ml contre *Escherichia coli* pendant la durée testée.

Contrairement à *Escherichia coli*, la figure II.19, représente la résistance remarquable de *S. aureus* à l'extrait éthanolique. Ceci peut être expliqué par la multirésistance de la souche testée. L'activité antimicrobienne peut être dû à des variations dans la composition de la paroi cellulaire des bactéries, qui peut affecter la perméabilité aux composés de l'extrait. Une CMI plus basse indique une meilleure efficacité antimicrobienne.

Les mécanismes de l'action antibactérienne des polyphénols peuvent être multiples et dépendent probablement de chaque micro-organisme (sensibilité des souches testées). Plusieurs études ont attribué l'effet inhibiteur des extraits de plantes contre les pathogènes bactériens à leur composition phénolique [56].

Les polyphénols peuvent provoquer des changements morphologiques dans les cellules bactériennes et endommager les parois cellulaires des bactéries, y compris la membrane interne et la membrane externe, ce qui entraîne la fuite de composants

intracellulaires. Des modifications de la forme des cellules, des formes irrégulières, des rides à la surface des bactéries et la formation d'agrégats cellulaires peuvent être observés [57].

Le site d'activité antibactérienne des composés phénoliques est strictement lié à leur structure chimique, y compris la position et le nombre de groupes hydroxyle ou méthoxyle, ainsi qu'à la présence de groupes galloyle dans la structure chimique de la catéchine [58].

En plus, l'activité antimicrobienne est dépendante des caractères physico-chimiques des composés phytobiotiques et des souches employées [59,60].

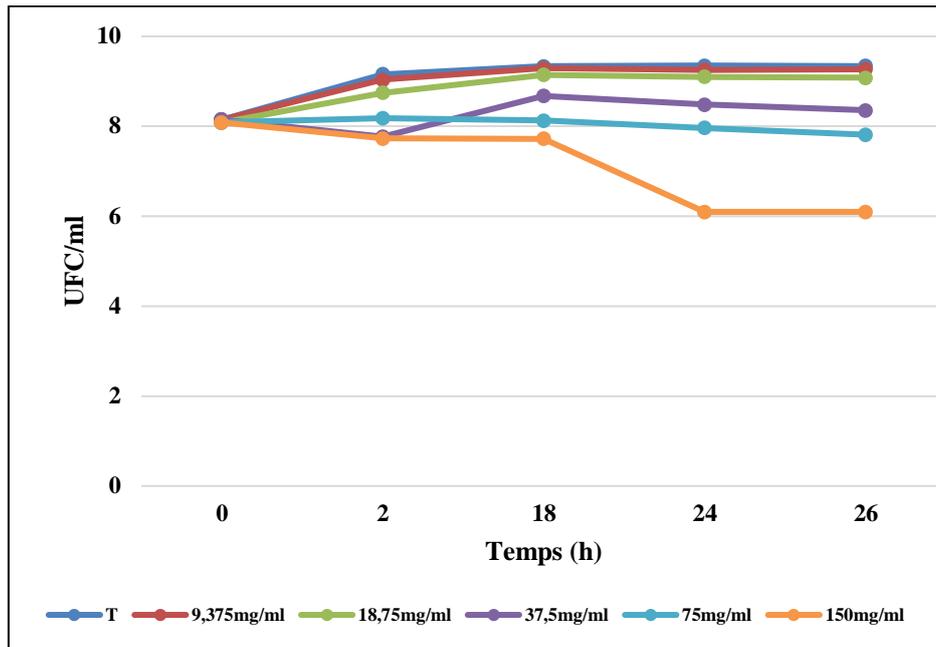


Figure II.18 : Effet de l'extrait éthanologique *N. sativa* sur la cinétique de croissance de *E. coli*

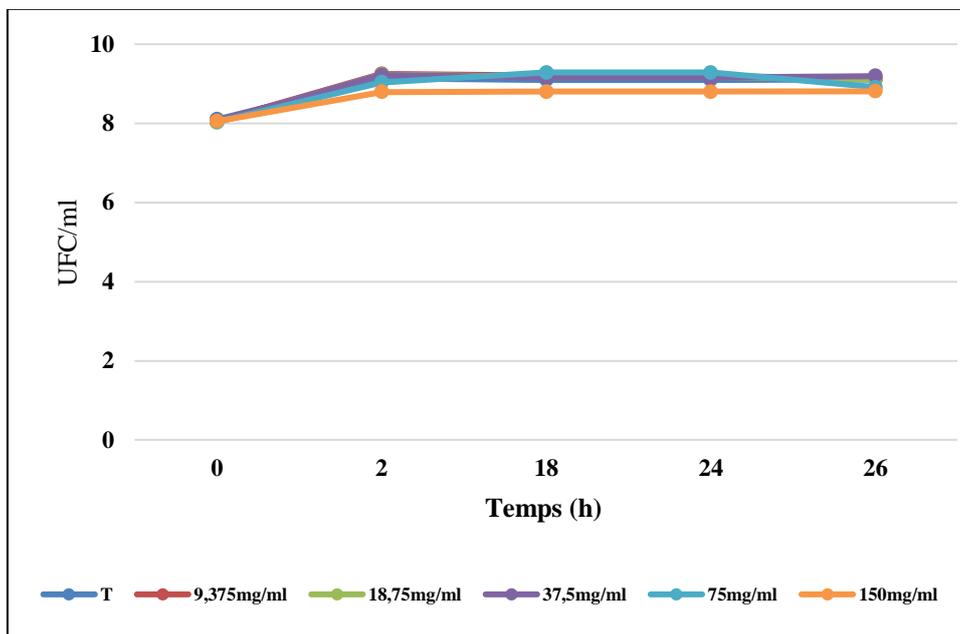


Figure II.19 : Effet de l'extrait éthanologique *N. sativa* sur la cinétique de croissance de *S. aureus*

II.9. Conclusion

Notre étude a révélé que le temps d'extraction, la température et la concentration du solvant exercent un impact substantiel sur les teneurs en composés phénoliques en extraits de *Nigella sativa*, ainsi que sur leurs propriétés antioxydantes.

Les quantités maximales de composés phénoliques totaux (TPC) et les activités de piégeage des radicaux (DPPH) atteignent respectivement 35,6 mg GAE/g et 70,5 %. En outre, le processus d'optimisation de l'extraction assistée par ultrasons (EAU) démontre une forte influence de la température de sonication, la durée et la concentration d'éthanol sur les teneurs en composés phénoliques présents dans les extraits de *Nigella sativa*, ainsi que sur leurs propriétés antioxydantes, avec des conditions optimales de 44,68 °C, 32,51 minutes et 59,18 % respectivement.

Les valeurs élevées de R² indiquent que les résultats expérimentaux concordent étroitement avec les valeurs prédites, démontrant ainsi l'efficacité des modèles pour prédire des résultats optimaux.

De plus, l'analyse du profil phénolique par HPLC-UV révèle la présence de six polyphénols dans l'extrait conventionnel, dont seulement quatre dépassent la limite de quantification (LOQ), à savoir la catéchine (0,18 mg/g), l'épicatéchine (1,88 mg/g), l'acide caféique (0,17 mg/g) et la rutine (0,96 mg/g). L'extrait obtenu par extraction non-conventionnel (EAU) et dans les conditions optimales, la quantification était possible pour cinq composés, tandis que l'acide gallique était également inférieur à la LOQ. Les teneurs en catéchine, épicatechine, rutine et quercétin étaient respectivement de 0,27, 2,37, 1,21 mg/g et 0,15 mg/g, ainsi qu'il présente des teneurs totales en composés phénoliques et une activité de piégeage des radicaux DPPH supérieures à celles de l'extrait conventionnel. Dans l'ensemble, il est établi que certains des polyphénols présents dans cette matrice possèdent une capacité antioxydante significative.

En ce qui concerne l'activité antimicrobienne, on a noté que l'extrait éthanolique des graines de *Nigella sativa* présente une activité antimicrobienne faible contre les deux souches *Escherichia coli* et *S. aureus*. Cet extrait possède un effet bactéricide avec une CMB de (75 mg/ml) contre *Escherichia coli*, tandis que l'effet de cet extrait n'était pas clairement visible contre *S. aureus*.

En conclusion, cette étude met en évidence l'efficacité de l'extraction assistée par ultrasons pour extraire les composés phénoliques des graines de *Nigella sativa*. Elle suggère que les graines de *Nigella sativa* peuvent constituer une source potentielle de produits chimiques bioactifs et de composés phénoliques.

Références bibliographiques

- [1] Naczki, M. & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: pp 95–111.
- [2] Hismath, I., Wan Aida, M. & Ho, C.W., (2011). Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem, (*Azadirachta indica*) leaves. *International Food Research Journal*, 18(3): pp 931-939.
- [3] Wissam, Z., Bashour Ghada, B., Wassim, A. & Warid, K. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3): pp 675 - 682.
- [4] Ribéreau-Gayon, P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed: DUNOD, Paris, pp 173 - 201.
- [5] Velickovic, D. T., Milenovic, D. M., Ristic, M. S. & Veljkovic, V. B. (2006). Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. *Ultrasonic Sonochemistry*, 13: pp 150 - 156.
- [6] Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M. & Velić, D. (2011). Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3): pp 195-199.
- [7] Tabart, J., Kevers, C., Sipel, A., Pincemail, J., Defraigne, J. O. & Dommes, J. (2007). Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and stability during storage. *Journal of Food Chemistry*, 105 : pp 1268-1275.
- [8] KHENFER, S., & MEDJOUEL, M. (2016). Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques d'une plante médicinale de la région sud du Sahara Algérien (Doctoral dissertation, UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA).
- [9] Adila, B., Ammimour, A., & BOUTAOUI, N. E. (2022). Optimisation de l'extraction des composés phénoliques d'une espèce de la famille Fabacée et évaluation pharmacologique (Doctoral dissertation, Université de jijel).
- [10] BENKADDOUR, M. (2019). Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques chez *Thapsia garganica* L (Doctoral dissertation).
- [11] Hossain, M.B. ; Brunton, N.P. ; Patras, A. ; Tiwari, B. ; O'Donnell, C.P. ; Martin-Diana, A.B. ; Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Marjoram (*Origanum majorana* L.) Using Response Surface Methodology. *Ultrason. Sonochem.*, 19, 582–590.

- [12] Hadidi, M.; Motamedzadegan, A.; Jelyani, A.Z.; Khashadeh, S. (2021). Nanoencapsulation of Hyssop Essential Oil in Chitosan-Pea Protein Isolate Nano-Complex. *LWT*, 144, 111254.
- [13] Chouana, T., Pierre, G., Vial, C., Gardarin, C., Wadouachi, A., Cailleu, D., ... & Delattre, C. (2017). Structural Characterization and Rheological Properties of a Galactomannan from *Astragalus Gombo* Bunge Seeds Harvested In Algerian Sahara. *Carbohydrate Polymers*, 175, 387-394.
- [14] Vega, A. J. D., Hector, R. E., Jose, L. G. J., Paola, H. C., Raúl, A. S., & Enrique, O. V. C. (2017). Effect of Solvents and Extraction Methods on Total Anthocyanins, Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of *Renealmia Alpinia* (Rottb.) Maas Peel. *Czech Journal of Food Sciences*, 35(5), 456-465.
- [15] Pandey, A., Belwal, T., Sekar, K. C., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2018). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction (Uae) Of Phenolics and Antioxidant Compounds from Rhizomes of *Rheum Moorcroftianum* Using Response Surface Methodology (Rsm). *Industrial Crops and Products*, 119, 218-225.
- [16] Yancheshmeh, B.S.; Panahi, Y.; Allahdad, Z.; Abdolshahi, A.; Zamani, Z. (2022). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from *Achillea Kellalensis* Using Response Surface Methodology. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, 28, 100355.
- [17] Badwaik, L.S.; Prasad, K.; Deka, S.C. (2012). Optimization of Extraction Conditions by Response Surface Methodology for Preparing Partially Defatted Peanut. *Int. Food Res. J.*, 19, 341–346.
- [18] Rohilla, S.; Mahanta, C.L. (2021). Optimization of Extraction Conditions for Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Tamarillo Fruit (*Solanum Betaceum*) Using Response Surface Methodology. *J. Food Meas. Charact.*, 15, 1763–1773.
- [19] Gandhi, G.R.; Ignacimuthu, S.; Paulraj, M.G. (2011). *Solanum Torvum* Swartz Fruit Containing Phenolic Compounds Shows Antidiabetic and Antioxidant Effects in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Food Chem. Toxicol.*, 49, 2725–2733.
- [20] Gullon, B.; Gullon, P.; Lu-Chau, T.A.; Moreira, M.T.; Lema, J.M.; Eibes, G. (2017). Optimization of Solvent Extraction of Antioxidants from *Eucalyptus Globulus* Leaves by Response Surface Methodology: Characterization and Assessment of Their Bioactive Properties. *Ind. Crops Prod.*, 108, 649–659.

- [21] Hammi, K.M.; Jdey, A.; Abdelly, C.; Majdoub, H.; Ksouri, R. (2015). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Tunisian Zizyphus Lotus Fruits Using Response Surface Methodology. *Food Chem.*, 184, 80–89.
- [22] Irakli, M.; Chatzopoulou, P.; Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds: Oleuropein, Phenolic Acids, Phenolic Alcohols and Flavonoids from Olive Leaves and Evaluation of Its Antioxidant Activities. *Ind. Crops Prod.*, 124, 382–388.
- [23] Medina-Torres, N.; Ayora-Talavera, T.; Espinosa-Andrews, H.; Sanchez-Contreras, A.; Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7, 47.
- [24] Brahmi, F.; Blando, F.; Sellami, R.; Mehdi, S.; de Bellis, L.; Negro, C.; Haddadi-Guemghar, H.; Madani, K.; Makhoulf-Boulekbatche, L. (2022). Optimization of the Conditions for Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Opuntia Ficus-Indica* [L.] Mill. Flowers and Comparison with Conventional Procedures. *Ind. Crops Prod.*, 184, 114977.
- [25] Katsampa, P.; Valsamedou, E.; Grigorakis, S.; Makris, D.P. (2015). A Green Ultrasound-Assisted Extraction Process for the Recovery of Antioxidant Polyphenols and Pigments from Onion SolidWastes Using Box-Behnken Experimental Design and Kinetics. *Ind. Crops Prod.*, 77, 535–543.
- [26] Casagrande, M.; Zanela, J.; Wagner, A.; Busso, C.; Wouk, J.; Iurckevicz, G.; Montanher, P.F.; Yamashita, F.; Malfatti, C.R.M. (2018). Influence of Time, Temperature and Solvent on the Extraction of Bioactive Compounds of *Baccharis Dracunculifolia*: In Vitro Antioxidant Activity, Antimicrobial Potential, and Phenolic Compound Quantification. *Ind. Crops Prod.*, 125, 207–219.
- [27] Chew, Y.L.; Ling Chan, E.W.; Tan, P.L.; Lim, Y.Y.; Stanslas, J.; Goh, J.K. (2011). Assessment of Phytochemical Content, Polyphenolic Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Leguminosae Medicinal Plants in Peninsular Malaysia. *BMC Complement. Altern. Me.d*, 11, 12.
- [28] Shahwar, D., & Raza, M. A. (2012). Antioxidant Potential Of Phenolic Extracts Of *Mimusops Elengi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(7), 547-550.
- [29] Xu, Y. B., Chen, G. L., & Guo, M. Q. (2019). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Crude Extracts of *Moringa Oleifera* from Kenya and Their Correlations with Flavonoids. *Antioxidants*, 8(8), 296.

- [30] Kholkhal, F. (2014). Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*. Thèse de Doctorat, Université Aboubaker Belkaid, p 111.
- [31] Madhujith, T.; Shahidi, F. (2006). Optimization of the Extraction of Antioxidative Constituents of Six Barley Cultivars and Their Antioxidant Properties. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 8048–8057.
- [32] Fadimu, G.J.; Ghafoor, K.; Babiker, E.E.; Al-Juhaimi, F.; Abdulraheem, R.A.; Adenekan, M.K. (2020). Ultrasound-Assisted Process for Optimal Recovery of Phenolic Compounds from Watermelon (*Citrullus Lanatus*) Seed and Peel. *J. Food Meas. Charact.*, 14, 1784–1793.
- [33] Sahin, S.; Samli, R. (2013). Optimization of Olive Leaf Extract Obtained by Ultrasound-Assisted Extraction with Response Surface Methodology. *Ultrason. Sonochem.*, 20, 595–602.
- [34] Prasad, K.N.; Hassan, F.A.; Yang, B.; Kong, K.W.; Ramanan, R.N.; Azlan, A.; Ismail, A. (2011). Response Surface Optimisation for the Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacities of Underutilised *Mangifera Pajang* Kosterm. Peels. *Food Chem.*, 128, 1121–1127.
- [35] Tomsik, A.; Pavlic, B.; Vlastic, J.; Ramic, M.; Brindza, J.; Vidovic, S. (2016). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Wild Garlic (*Allium Ursinum* L.). *Ultrason. Sonochem.*, 29, 502–511.
- [36] Almusallam, I.A.; Mohamed Ahmed, I.A.; Babiker, E.E.; al Juhaimi, F.Y.; Fadimu, G.J.; Osman, M.A.; al Maiman, S.A.; Ghafoor, K.; Alqah, H.A.S. (2021). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Properties from Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Spikelets Using Response Surface Methodology. *LWT*, 140, 110816.
- [37] Bouafia, M.; Colak, N.; Ayaz, F.A.; Benarfa, A.; Harrat, M.; Gourine, N.; Yousfi, M. (2021). The Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of *Centaurea* Sp. Antioxidative Phenolic Compounds Using Response Surface Methodology. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, 25, 100330
- [38] Belfar Chaima, B. K. (2021). Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux d'*Asparagus acutifolius* en Algérie (Doctoral dissertation).
- [39] Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B. (2013). The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia Officinalis* L.) Extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 84-91.

- [40] Mohammadpour, H., Sadrameli, S. M., Eslami, F., & Asoodeh, A. (2019). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Moringa Peregrina Oil with Response Surface Methodology and Comparison with Soxhlet Method. *Industrial Crops and Products*, 131, 106-116.
- [41] Bouaoudia-Madi, N.; Boulekbache-Makhlouf, L.; Madani, K.; Silva, A.M.S.; Dairi, S.; Oukhmanou-Bensidhoum, S.; Cardoso, S.M. (2019). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from *Myrtus Communis* L. Pericarp. *Antioxidants*, 8, 205.
- [42] Ani, V.; Varadaraj, M.C.; Naidu, K.A. Antioxidant and Antibacterial Activities of Polyphenolic Compounds from Bitter Cumin (*Cuminum nigrum* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 224, 109–115.
- [43] Hameed, S.; Imran, A.; Nisa, M.U.; Arshad, M.S.; Saeed, F.; Arshad, M.U.; Asif Khan, M. (2019). Characterization of Extracted Phenolics from Black Cumin (*Nigella sativa* Linn), Coriander Seed (*Coriandrum sativum* L.), and Fenugreek Seed (*Trigonella Foenum-Graecum*). *Int. J. Food Prop.*, 22, 714–726.
- [44] Muzolf-Panek, M.; Stuper-Szablewska, K. (2021). Comprehensive Study on the Antioxidant Capacity and Phenolic Profiles of Black Seed and Other Spices and Herbs: Effect of Solvent and Time of Extraction. *J. Food Meas. Charact.*, 15, 4561–4574.
- [45] Feng, Y.; Dunshea, F.R.; Suleria, H.A.R. (2020). LC-ESI-QTOF/MS Characterization of Bioactive Compounds from Black Spices and Their Potential Antioxidant Activities. *J. Food Sci. Technol.*, 57, 4671–4687.
- [46] Ponce, A., et al., (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*. 367, 679- 684.
- [47] Farhad Sharafati Chaleshtori, (2018). Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of *Bunium persicum*, *Eucalyptus globulus*, and Rose Water on Multidrug-Resistant *Listeria* Species, *25 Journal of evidence-Based integrative Medicine*.
- [48] Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K et al. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 3-12.
- [49] Bakasso, S. (2009). Études phytochimiques et potentialités biologiques de cinq espèces d'indigofera (fabaceae) utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso (Thèse de Doctorat), Université d'Ouagadougou.
- [50] Ben Hsouna, A., Alayed, A.S & Abdallah, E.M. (2012). Evaluation of antimicrobial activities of crude methanolic extract of pods of *Ceratonia siliqua* L against some pathogens and spoilage bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 6(14), 3480-3484.

- [51] Burt, S.A. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- [52] Brantner, A., Males, Z., Pepeljnjak, S & Antolic, A. (1996). Antimicrobial activity of *Paliurus spinachristi* Mill (Christ's thorn). *Journal of Ethnopharmacology*, 52(2), 119-122.
- [53] Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M & Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- [54] Erbil, N., Duzguner, V., Durmuskahya, C & Alan, Y. (2015). Antimicrobial and Antioxidant Effects of Some Turkish Fodder Plants Belongs to Fabaceae Family (*Vicia villosa*, *Trifolium ochroleucum* and *Onobrychis altissima*). *Oriental journal of chemistry*, 31(1), 53-58.
- [55] Rodríguez, N., Amils, R., Jiménez-Ballesta, R., Rufo, L., & de la Fuente, V. (2007). Heavy metal content in *Erica andevalensis*: an endemic plant from the extreme acidic environment of Tinto River and its soils. *Arid Land Research and Management*, 21(1), 51-65.
- [56] Panda, S. K., Das, R., Leyssen, P., Neyts, J., & Luyten, W. (2018). Assessing medicinal plants traditionally used in the Chirang Reserve Forest, Northeast India for antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 225, 220-233.
- [57] Efenberger-Szmechtyk, M., Nowak, A., & Cyzowska, A. (2021). Plant extracts rich in polyphenols: Antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(1), 149-178.
- [58] Sari, M., Biondi, D. M., Kaâbeche, M., Mandalari, G., D'Arrigo, M., Bisignano, G., ... & Ruberto, G. (2006). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and fragrance journal*, 21(6), 890-898.
- [59] Fettah, A. (2019). Etude phytochimique et évaluation de l'activité biologique (antioxydante-antibactérienne) des extraits de la plante *Teucrium polium* L. sous espèce *Thymoïdes* de la région Beni Souik, Biskra (Doctoral dissertation, UNIVERSITE MOHAMED KHIDER BISKRA).
- [60] Bouharb, H. A. Y. A. T. E., El Badaoui, K. H. A. L. I. D., Zair, T. O. U. R. I. Y. A., Chakir, S., & Alaoui, T. (2014). Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences*, 78, 6685-6693.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Actuellement, l'intérêt croissant pour l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie découle de divers facteurs qui suscitent un vif intérêt dans la recherche biomédicale. Cette tendance s'explique d'une part par le fait que les plantes médicinales offrent une source inépuisable de substances naturelles bioactives et de composés bénéfiques. D'autre part, elle est motivée par la quête d'une approche thérapeutique plus douce, dépourvue d'effets secondaires indésirables.

Dans ce contexte, l'étape cruciale de l'extraction des composés phénoliques émerge comme un aspect clé de la valorisation de ces principes actifs. Le succès de cette extraction repose sur le choix judicieux de la méthode et des paramètres, visant à préserver les propriétés biologiques des composés extraits.

Les antioxydants naturels revêtent une importance significative dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires, où ils sont recherchés comme alternatives préférées aux antioxydants synthétiques. Parmi les sources végétales, *Nigella sativa*. L se distingue comme une ressource largement riche en antioxydants.

Les résultats de la présente étude montrent clairement que le temps d'extraction, la température et la concentration du solvant ont un impact significatif sur les teneurs en composés phénoliques, présents dans les extraits de *Nigella sativa*, ainsi que sur leurs propriétés antioxydantes. La quantité la plus élevée de composés phénoliques totaux (TPC) et les activités de piégeage des radicaux (DPPH) étaient de 35,6 mg GAE/g et 70,5 %, respectivement. En outre, le processus d'optimisation de l'EAU démontre une forte influence de la température de sonication, le temps et la concentration d'éthanol sur le rendement des composés phénoliques, avec des conditions optimales de 44,68 °C, 32,51 min et 59,18 %, respectivement. Les valeurs de R^2 indiquent que les valeurs obtenues expérimentalement sont très proche aux valeurs prédites, et également suggéré que les modèles étaient très efficaces pour prédire les résultats optimaux.

Concernant l'activité antimicrobienne, l'extrait éthanolique des gaines de *Nigella Sativa* n'a montré aucun effet antimicrobien contre les souches testées. Cet extrait possède un effet bactéricide avec une CMB de (75 mg/ml) contre *Escherichia coli*, tandis que l'effet de cet extrait n'était pas clairement visible contre *S. aureus*.

Conclusion générale

En outre, selon le profil phénolique HPLC-UV, six polyphénols ont été trouvés dans l'extrait conventionnel, mais seuls quatre d'entre eux étaient supérieurs à la LOQ, à savoir la catéchine (0,18 mg/g), l'épicatéchine (1,88 mg/g), l'acide caféique (0,17 mg/g) et la rutine (0,96 mg/g). L'extrait obtenu par extraction non-conventionnel (EAU) et dans les conditions optimales, la quantification était possible pour cinq composés, tandis que l'acide gallique était également inférieur à la LOQ. Les teneurs en catéchine, épicatechine, rutine, acide caféique et quercetin étaient respectivement de 0,27, 2,37, 1,21, 0,17 mg/g et 0,15 mg/g. Ce dernier présentait une teneur phénolique totale et une activité de piégeage du radical DPPH plus élevées que l'extrait obtenu par la technique conventionnelle. Dans l'ensemble, il a été établi que certains polyphénols inclus dans cette matrice avaient une capacité antioxydante significative.

Enfin, ces résultats indiquent que l'extraction assistée par ultrasons a montré son efficacité pour l'extraction des composés phénoliques, ainsi les graines de *Nigella sativa* peuvent être une source potentielle de produits chimiques bioactifs et de composants phénoliques.

L'étude approfondie de cette plante offre **des perspectives** prometteuses pour la découverte et l'utilisation de composés bénéfiques dans divers domaines d'application.

Plusieurs travaux peuvent être envisagés dans la continuité des travaux entamés :

- ✓ Elargir le cadre de l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques par l'utilisation d'autres méthodes d'extraction avec l'étude de l'effet des autres paramètres comme : la taille des particules, le rapport solide /liquide.
- ✓ Elargir le panel des activités antioxydantes in vitro et in vivo et pourquoi pas d'autres tests biologiques : anti tumorale, anti cancéreux, anti inflammatoire, anti diabétique, anti coagulant et autres.
- ✓ Identification des principes actifs responsables de ces activités pharmacologiques, avec la détermination des conditions optimales pour l'extraction de ces principes actifs.

Annexes

Annexe I

1.1. Les appareils utilisés

Pulverisette 14 FRITSCH (Idar-Oberstein, Allemagne)

Caractéristiques de performance

- Puissant régime de 22 000 tr/min. pour un débit d'échantillon particulièrement rapide
- Vitesse d'impact du rotor extrêmement élevée (111 m/s = 399,6 km/h)
- Taille initiale maximum des matériaux à broyer < 15 mm, quantité de débit de 15 l/h et plus
- Granulométrie finale jusqu'à $d_{50} < 40 \mu\text{m}$, tamis annulaires 0,08 – 6 mm
- Multifonctionnel avec son rotor à impact et son rotor de coupe en un seul et même appareil
- Les échantillons difficiles à broyer ou sensibles à la température peuvent être fragilisés par l'ajout de d'azote liquide et ensuite broyé
- Système « Intelligence Safety Control » garantit un travail en toute sécurité
- Broyage par lot ou continu grâce au cyclone FRITSCH
- Refroidissement efficace de la chambre de broyage grâce à un débit d'air très élevé
- Nettoyage simplissime grâce au Clean Design
- Filtre à poussière amovible pour un nettoyage facile



Ultrasons UP200S (Hielscher, Berlin, Allemagne)

Caractéristiques de performance

- Volume de l'échantillon 0,1 - 1000 ml
- Performance 200 watts
- Fréquence 40 kHz
- Amplitude 20-100 %
- Opération pulsée 0-100 %
- Connexion au réseau 230 V, 50-60 Hz
- Poids de l'équipement 2,3 kg



Lyophilisateur Telestar (Berlin, Allemagne)

Caractéristiques de performance

- Température du condenseur : -55 °C ou -85 °C
- Une capacité en glace jusqu'à 6 kg /24 heures
- Condenseur en inox 316L pour une bonne résistance chimique
- Une lyophilisation en manifolds, en chambre ou sur plateaux
- Des capacités et des accessoires variés pour des configurations les plus diverses et variées
- Ecran tactile pour le réglage et l'affichage des paramètres



Spectrophotomètre UV-Visible V-750 (Jasco, Tsukuba, Japon)

Caractéristiques de performance

- Double faisceau
- 190-900 nm
- Bandes passantes variables
- Très hautes Absorbances



Article

Phenolics from Defatted Black Cumin Seeds (*Nigella sativa* L.): Ultrasound-Assisted Extraction Optimization, Comparison, and Antioxidant Activity

Abdelkrim Gueffai ¹, Diego J. Gonzalez-Serrano ², Marios C. Christodoulou ³, Jose C. Orellana-Palacios ², Maria Lopez S. Ortega ², Aoumria Ouldoumna ^{1,*}, Fatima Zohra Kiari ¹, Georgia D. Ioannou ³, Constantina P. Kapnissi-Christodoulou ³, Andres Moreno ^{2,*} and Milad Hadidi ^{2,*}

¹ Department of Process Engineering, Faculty of sciences and Technology, University of Mustapha Stambouli Mascara, Mascara 29000, Algeria

² Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemical Sciences and Technologies, University of Castilla-La Mancha, 13071 Ciudad Real, Spain

³ Department of Chemistry, University of Cyprus, Nicosia 1678, Cyprus

* Correspondence: aoumria.ouldmoumna@univ-mascara.dz (A.O.); andres.moreno@uclm.es (A.M.); milad.hadidi@uclm.es (M.H.)



Citation: Gueffai, A.; Gonzalez-Serrano, D.J.; Christodoulou, M.C.; Orellana-Palacios, J.C.; Ortega, M.L.S.; Ouldoumna, A.; Kiari, F.Z.; Ioannou, G.D.; Kapnissi-Christodoulou, C.P.; Moreno, A.; et al. Phenolics from Defatted Black Cumin Seeds (*Nigella sativa* L.): Ultrasound-Assisted Extraction Optimization, Comparison, and Antioxidant Activity. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1311. <https://doi.org/10.3390/biom12091311>

Academic Editor: Robert V. Stahelin

Received: 12 August 2022

Accepted: 12 September 2022

Published: 16 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: An ultrasound-assisted method was used for the extraction of phenolics from defatted black cumin seeds (*Nigella sativa* L.), and the effects of several extraction factors on the total phenolic content and DPPH radical scavenging activity were investigated. To improve the extraction efficiency of phenolics from black cumin seed by ultrasonic-assisted extraction, the optimal extraction conditions were determined as follows: ethanol concentration of 59.1%, extraction temperature of 44.6 °C and extraction time of 32.5 min. Under these conditions, the total phenolic content and DPPH radical scavenging activity increased by about 70% and 38%, respectively, compared with conventional extraction. Furthermore, a complementary quantitative analysis of individual phenolic compounds was carried out using the HPLC-UV technique. The phenolic composition revealed high amounts of epicatechin (1.88–2.37 mg/g) and rutin (0.96–1.21 mg/g) in the black cumin seed extracts. Ultrasonic-assisted extraction can be a useful extraction method for the recovery of polyphenols from defatted black cumin seeds.

Keywords: phenolic compounds; antioxidant; optimization; ultrasonic; extraction techniques; black cumin

1. Introduction

Black cumin (*Nigella sativa* L.), an herbaceous plant member of the Ranunculaceae family, is one of the most popular medicinal herbs in the north of Africa, with wild populations distributed in Asia, Southern Europe, Northern Africa, and the Mediterranean area. Black cumin seeds have a long history in pharmacotherapy as a medicinal herb used in traditional remedies to treat a broad variety of diseases, including diabetes, different airway disorders, paralysis, digestive tract issues, inflammation, and hypertension [1]. These medicinal properties of black cumin seeds are directly connected with their high content of phenolic compounds, which act as antioxidants and display an extremely anti-inflammatory capacity [2]. Oilseeds are important sources of lipid, commonly processed for the extraction of edible oils, producing large quantities of bioactive compound-rich meal [3]. Thus, defatted black cumin seeds (black cumin seed meal) could be an interesting source of this type of compound.

One of the key indicators for several progressive pathological illnesses, such as neurological problems and endocrine sickness, is oxidative stress, which is characterized by a rise in free radical levels [4]. The therapeutic efficacy of medicinal herbs acting as scavengers of free radicals has recently gained more attention. Studies conducted both in vivo

and in vitro on black cumin seed extracts have shown that they have strong antioxidant properties [5]. Similarly, an indicator of the remarkable bioactive capacity of black cumin seeds could be found in their traditional consumption for the treatment of a diverse range of illnesses [6]. Thus, black cumin extracts may be a possible source of innovative antioxidant and anti-inflammatory phenolic compounds, safer than current medications, which frequently, after prolonged use, cause serious negative consequences such as gastric ulcers, bone marrow depression, and water and salt retention [7].

Recently, studies focused on identifying different fruit, vegetables, and plants as new sources of bioactive components have increased considerably since these natural products have a broad variety of health benefits for humans [8,9]. Such components are usually obtained through a lengthy and expensive process that includes extraction, isolation, and identification, frequently leading to the heat breakdown of certain bioactive components [10]. Natural phenolic compounds have tremendous potential for prevention, preservation, and therapy, which has led to a surge in interest regarding their appropriate extraction method [11]. Techniques used for both conventional and non-conventional bioactive component extraction have been distinguished. Traditional or conventional extraction methods present some important drawbacks, including higher extraction time and more solvent use [12]; non-conventional techniques, such as microwave-assisted or ultrasound-assisted extraction, have proved to be not only more sustainable but also more effective alternatives [13,14].

Ultrasound-assisted extraction is one of the most safe, rapid, and efficient non-conventional extraction methods. In many cases, ultrasound irradiation minimizes the destruction of thermosensitive chemicals, also using less solvent, taking less time, and producing greater extraction yields [15]. Ultrasound treatment implies the breakage of cell walls through the bursting of bubbles created by sonic cavitation, improving mass transference of the cellular content to the solvent and thus increasing the extraction yield of bioactive compounds [13]. Ultrasound-assisted extraction is also frequently used in the food industry since it is a safe and green way to speed up chemical processes [16].

Response Surface Methodology (RSM) is commonly used to optimize extraction processes. Although the traditional approach requires excessive time and yields insufficient information, RSM is a quick alternative that offers sufficient data for a wide variety of independent variables, also considering the interaction between these factors [17,18]. In this regard, RSM is defined as a collection of statistical and mathematical tools used to model and analyze problems whose responses are influenced by different variables. The primary benefit of this tool is the use of only a small number of statistically significant experiments to evaluate numerous factors and their interactions, saving time and providing a large amount of data [19,20].

To the best of our knowledge, the current study represents the first attempt to optimize the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from defatted black cumin seeds, seeking to maximize total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity (DPPH method). For this purpose, RSM was selected to conduct the optimization process, employing the following three-level independent factors: temperature (25, 50, and 75 °C), time (15, 30, and 45 min) and ethanol concentration (30, 60, and 90%). The results achieved were also compared with those obtained by the conventional method. Finally, the extracts recovered in both optimal and conventional conditions were analyzed by the High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector (HPLC-DAD) to identify and quantify the different phenolic compounds.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

All chemicals and reagents used in this study were analytical grade. The chemicals such as 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•), absolute ethanol (99.9%, *v/v*) and sodium carbonate (Na₂CO₃) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). LC-MS grade water, ethanol and acetonitrile were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim,

Germany), while trifluoroacetic acid (TFA) bought from Merck (Darmstadt, Germany). Catechin, myricetin, and quercitrin were provided by HWI ANALYTIK GMBH, while quercetin, epicatechin, sinapic acid, caffeic acid and gallic acid were acquired from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Rutin was purchased from PhytoLab GmbH & Co (Vestenbergsgreuth, Germany). Black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds were obtained from a local market in Mascara City (Mascara, Algeria) in March 2022.

2.2. Extraction of Phenolic Compounds from Black Cumin

2.2.1. Ultrasound-Assisted Extraction

Seeds were ground using a Pulverisette 14 mill (FRITSCH, Idar-Oberstein, Germany) to obtain a fine powder. Then, the obtained powder was defatted with hexane at room temperature (ratio of 1:20 *w/v*). The powder was kept in a clean, dried, well-sealed amber glass container to protect it from sunlight and stored in the refrigerator at 4 °C for further use.

A total of 5 g of the sample was combined with 200 mL of ethanol/water solution at different concentrations (30, 60, and 90%, *v/v*) to extract the phenolic components from the black cumin seeds. The samples were extracted using an ultrasonic bath (model UP200S, Hielscher, Berlin, Germany) that was partially filled with distilled water (about 3.0 dm³). The extraction procedures were carried out using three different ultrasonic temperatures of 25, 50, and 75 °C, for 15, 30, and 45 min, with a continuous power of 110 W and a frequency of 40 kHz. Then, the extracts were filtered with Whatman No. 1 filter paper at room temperature. The filtered solution was recovered and evaporated using a rotary evaporator for 30 min at 40 °C. The remaining samples were freeze-dried at –80 °C for 24 h and kept at 4 °C for further experiments. The sample redissolved in the solvent after evaporation to obtain 2 mg/mL of each extract.

2.2.2. Conventional Extraction

The conventional extraction method followed the procedure described by Bouaoudia-Madi et al. [21] with some minor modifications. Briefly, 5 g of sample was placed in a conical flask and mixed with 200 mL of 50% (*v/v*) ethanol solution. Then, the mixture was stirred for 2 h at 50 °C, filtered employing Whatman No. 1 filter paper and finally stored at 4 °C for further analysis.

2.3. Determination of DPPH Radical Scavenging Activity

DPPH radical scavenging activity was measured according to the method of Li, Du, Jin, and Du [10]. Briefly, 2 mL of 0.25 mmol/L DPPH• methanolic solution was mixed with 1 mL of black cumin seed extract, vortexed, and left at room temperature (25 °C) in a dark place for 30 min. The control was made without extracts, and both the sample mixtures and the control were measured for absorbance at 517 nm (V-750 spectrophotometer, Jasco, Tsukuba, Japan). The following equation was used to calculate the percentage of DPPH• that black cumin seed extracts were able to scavenge.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

where A_{control} is the absorbance of DPPH• methanolic solution and A_{sample} is the absorbance of DPPH• solution mixed with the sample extract.

2.4. Determination of Total Phenolic Content (TPC)

The TPC of the samples was assessed using the Folin–Ciocalteu assay based on the Zakaria et al. method [19] with some modifications. A total of 1 mL of sample containing 1.0 mg/mL of a standard gallic acid solution was mixed with 0.5 mL of the Folin–Ciocalteu reagent for every extract, and the mixture was left at room temperature for 3 min. The Na₂CO₃ solution was prepared at a concentration of 7.5% (*w/v*) then heated for 1 min at

95 °C and cooled at room temperature. Next, 1.0 mL of 7.5% Na₂CO₃ was added to the sample or gallic acid solution. After 1 h of incubation at room temperature in a dark place, the absorbance of the sample was determined at 760 nm using a UV-Vis spectrometer (V-750 spectrophotometer, Jasco, Tsukuba, Japan). Gallic Acid (mg) was used as a standard to plot the calibration curve. TPC of the extracts was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) per gram of sample in dry weight (mg/g).

2.5. Determination of Phenolic Profile

2.5.1. Method Validation

The current analytical method was validated according to linearity, limit of detection, limit of quantification and precision in terms of reproducibility (intraday validation) and repeatability (interday validation). For intraday assay, six successive HPLC analyses of standard solutions were performed on the same day, while in the case of interday validation, the analysis was conducted on five consecutive days. At least five different concentrations were prepared for each analyte and the construction of calibration curves. The linear ranges for each analyte are represented in Table 1. The limits of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), used to assess the sensitivity of the method, were calculated based on the standard deviation of the response (σ) and the slope of the corresponding calibration curve [22]. The detection limits were expressed as:

- (1) LOD = 3.3 σ /Slope
- (2) LOQ = 10 σ /Slope

Table 1. Box–Behnken design matrix with coded variables and measured values.

Run	Factors			Responses	
	X ₁ : Ethanol Concentration (%)	X ₂ : Temperature (°C)	X ₃ : Time (min)	Y ₁ : TPC (mg GAE/g)	Y ₂ : DPPH (%)
1	60	25	45	28.4	65.1
2	30	25	30	25.7	44.8
3	60	75	15	21.8	35.5
4	60	50	30	35.1	70.5
5	30	50	45	24.3	39.4
6	90	25	30	24.5	44.5
7	30	50	15	24.3	36.8
8	60	50	30	35.6	68
9	60	75	45	21.1	44.5
10	60	50	30	35.2	69.1
11	60	50	30	35.1	69
12	60	25	15	22.2	41.5
13	90	75	30	19.2	45.4
14	90	50	45	22.6	64
15	30	75	30	20.4	35
16	90	50	15	19.3	38.8

2.5.2. HPLC-UV Analysis

For the chromatographic analysis, 8 mg of the freeze-dried samples were dissolved in 1 mL of ethanol (HPLC-MS grade). The final solutions were filtered through 0.45 μ m pore size PTFE syringe filters (LLG-Syringe filters SPHEROS, Meckenheim, Germany) and analyzed via the HPLC-UV system. HPLC-UV analysis was performed according to a previously reported method [23]. The polyphenolic existence of nine compounds was performed using an HPLC system from Shimadzu (Kyoto, Japan), equipped with a pump (LC-10AD), a PDA detector (SPD-M20A), an autosampler (SIL-20AHT) and a thermostat column compartment (CTO-10ASVP). The PDA detector was set at 280 nm for the determination of all analytes. For the chromatographic separation, a Venusil XBP C18 column (150 \times 4.6 mm, 5 μ m) and pre-column composed of the same material were used.

Mobile phase A consisted of Milli Q water while mobile phase B was ACN with 0.02% TFA. The method operated with a flow rate of 1.0 mL/min, while the injections were 20 μ L. The initial conditions of the gradient elution were 80% A for the first five min, followed by a stepwise decrease to 60% A until 8 min, after which there was a further decrease to 50% A until 12 min, and finally an increase to 60% until 17 min. The ratio of mobile phases was reset to the original composition at 21 min, where it remained constant until 25 min.

2.6. Response Surface Methodology (RSM)

The Box–Behnken design (BBD)-based response surface technique was applied to optimize the UAE parameters for the extraction of bioactive components from black cumin seeds. A total of 16 research experiments were carried out in the BBD. The ethanol concentration (X_1) (30, 60, and 90%), sonication temperature (X_2) (25, 50, and 75 $^{\circ}$ C), and sonication time (X_3) (15, 30, and 45 min) were the independent variables. The responses included the TPC and DPPH radical scavenging capacity. Table 1 displays the whole design matrix of UAE extraction variables and responses together with their corresponding levels and coded components. A second-order polynomial model was used to fit the responses of triplicate measurements of TPC and DPPH radical scavenging activity as follows:

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$$

where X_1 , X_2 , and X_3 represent the independent variables ethanol concentration, sonication temperature, and sonication time, respectively, and Y represents the expected responses (TPC and DPPH radical scavenging activity) from the black cumin extracts. A constant is represented by β_0 ; the linear regression coefficients are β_1 , β_2 , and β_3 ; the interaction terms are β_{12} , β_{13} , and β_{23} ; and the quadratic coefficients are β_{11} , β_{22} , and β_{33} . To visualize the relationships between the values of each independent variable and the responses, three-dimensional (3D) charts were made by using the polynomial equations.

3. Results and Discussion

3.1. Model Fitting and Statistical Analysis

The total efficiency of the UAE is determined by different experimental factors, including extraction temperature, time, and ethanol concentration. The results of 16 experimental runs using the Box–Behnken design are presented in Table 1, which contains the measured values for both responses (Y_1 and Y_2) for each trial. It is well recognized that certain variables, such as the sonication temperature, time, and ethanol concentration, have a substantial influence on the recovery of total phenolic content and antioxidant activity from plant materials. The TPC and DPPH radical scavenging activity values for black cumin seed were 19.2–35.6 mg GAE/g and 35–70.5%, respectively. This strongly suggests that the extraction conditions have a significant impact on the yield of these parameters. These results also indicate a substantial sensitivity of the recovery of phenolic antioxidants to the extraction conditions, thus highlighting the necessity to optimize UAE parameters to obtain maximal TPC and DPPH radical scavenging activity from black cumin seed [24].

Table 2 presents the ANOVA results, model adequacy, and regression coefficients. Additionally, various statistical indicators were used to assess the model adequacy, including the coefficient of correlation (R^2), adj- R^2 , and the coefficient of variation (CV). The coefficient of correlation (R^2) values of TPC and DPPH radical scavenging activity were 0.992 and 0.972, respectively. R^2 value was used to judge the model adequacy. The developed models that included both TPC and DPPH radical scavenging activity had a p -value of 0.0001, which means that they were significant. Diagnostic plots (Figure 1) are employed to investigate the model satisfactoriness and the relationship between predicted and experimental values. It is evident from Figure 1 that the data points lie very closely to the straight line with a high degree of similarity. A high correlation between the predicted and experimental data reflects the applicability and accuracy of RSM for optimization of the extraction process. Furthermore, the adj- R^2 values (0.9811–0.9320) show the model to be significant. On the other hand, low values of CV (3.2–7.16%) indicate that the actual

values are highly precise and reliable [20]. In most cases, it is necessary to verify that the fitted model gives a sufficient approach to the real system. The findings demonstrated that the models employed in this research were fitted, and the results of the experiment were reliable and exact for the prediction and optimization of UAE parameters to achieve a higher TPC and DPPH radical scavenging activity.

Table 2. Analysis of variance for the regression model of TPC and DPPH.

Source	TPC			DPPH		
	Coefficient Estimate	F-Value	p-Value	Coefficient Estimate	F-Value	p-Value
Model	35.25	87.37	<0.0001	69.15	23.84	0.0005
X ₁ -Ethanol con.	−1.14	15.01	0.0082	4.59	12.75	0.0118
X ₂ -Temperature	−2.29	60.71	0.0002	−4.44	11.93	0.0136
X ₃ -Time	1.10	14.04	0.0095	7.55	34.53	0.0011
X ₁ X ₂	0.0000	0.0000	1.0000	2.67	2.17	0.1914
X ₁ X ₃	0.8250	3.95	0.0941	5.65	9.67	0.0209
X ₂ X ₃	−1.72	17.26	0.0060	−3.65	4.03	0.0913
X ₁ ²	−6.78	266.25	<0.0001	−14.31	62.04	0.0002
X ₂ ²	−6.02	210.57	<0.0001	−12.41	46.66	0.0005
X ₃ ²	−5.85	198.51	<0.0001	−10.09	30.82	0.0014
Lack of Fit	-	23.34	0.0140	-	24.00	0.0134
R ²	0.9924			0.9728		
Adjusted R ²	0.9811			0.9320		
C.V.%	3.20			7.16		
Adeq Precision	24.71			13.37		

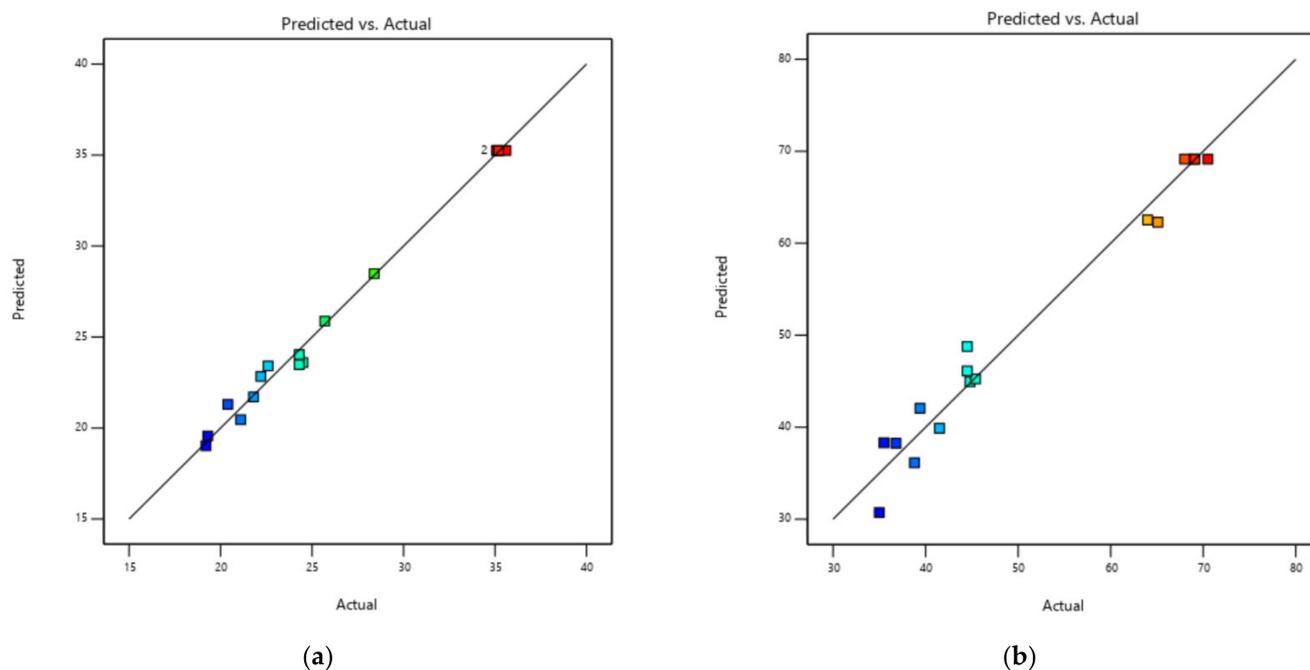


Figure 1. Diagnostic plots of predicted and actual values for TPC (a) and DPPH radical scavenging activity (b).

3.2. Influence of Process Variables on the TPC

Phenolic compounds can function as antioxidants due to their capacity to chelate metal ions and donate hydrogen atoms or electrons to stabilize free radicals. This prevents food products, particularly oils and fatty acids, from oxidizing [19]. The values of the experimental data along with the evaluation of the impact of independent factors on the

TPC of black cumin extract are shown in Table 1. The analysis of variance (ANOVA) findings indicated that the model was adequate for evaluating TPC, with a coefficient of determination (R^2) of 0.9924 (Table 2) [25]. The experimentally determined levels of TPC in black cumin seed varied from 19.2 mg GAE/g to 35.6 mg GAE/g. The circumstances in the UAE of 60% (ethanol concentration), 50 °C (temperature), and 30 min (time) resulted in the highest TPC (35.6 mg GAE/g). The TPC found in black cumin seed was higher than those observed in the following solanum species: *Solanum ferrugineum* (31.41 mg GAE/g), *S. melongena* (16.97 mg GAE/g), and *S. betaceum* (24.74 mg GAE/g) [26]. However, it was lower than the Gandhi et al. [27]-reported value of 280 mg GAE/g in the *S. torvum* Swartz extract. This may be caused by regional variances, the extraction method and conditions used. The following second-order polynomial equation was created to examine the impact of the independent variable on the extraction of TPC (Equation (1)).

$$Y_{\text{TPC}} = +35.25 - 1.14X_1 - 2.29 X_2 + 1.10X_3 - 1.72 X_2X_3 - 6.78X_1^2 - 6.02X_2^2 - 5.85X_3^2 \quad (1)$$

According to Table 2, the ethanol concentration (X_1), extraction temperature (X_2), and extraction time (X_3) all had a significant effects on the total phenolic content of black cumin seed ($p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.01$, respectively). Moreover, the impacts of the quadratic functions (X_1^2 , X_2^2 and X_3^2) and the interaction between extraction time and temperature (X_2X_3) had a significant ($p < 0.05$) impact on the UAE of TPC from black cumin extracts. Furthermore, the extraction yield of TPC from black cumin seed was unaffected by the interactions between the concentration of ethanol and time and the concentration of ethanol and temperature ($p > 0.05$).

As shown in Figure 2a, the TPC improves as the ethanol concentration increases from 30 to 60%. On the other hand, when the ethanol concentration increases to 90%, the TPC decreases regularly to less than 27 mg/g. According to Gullon et al. [28], these effects are a result of the polarity of the solvent having an impact on the extraction of phenolics. These authors also showed that the TPC of the extract from *Eucalyptus globulus* leaves was affected by a similar trend. In addition, when using ultrasound-assisted extraction, ethanol concentration had a similar dual impact on the TPC isolated from Tunisian *Zizyphus lotus* fruit [29]. Figure 2a shows that the sonication time has the most impact on the recovery of TPC. The extraction time was adjusted from 15 to 45 min to demonstrate how it affected TPC efficiency. The TPC increased when the extraction time was raised to 30 min. However, longer times implied a decrease in TPC. In a similar study, Irakli et al. [30] observed an increase in TPC in the first 30 min of extraction by UAE and then a sharp decrease in TPC. The sonication time is divided into two main stages when secondary metabolites are extracted by UAE. Most of the retrieved metabolites occur during the initial “washing stage” (20–30 min). Then comes the “slow extraction phase” which lasts for 60 to 100 min, when metabolites are transported by a diffusion process from the matrix to the solvent [31]. This two-stage division of the extraction could explain the results obtained, considering that the diffusion process may adversely affect the extraction yield when most of the phenolic compounds are already extracted [32]. Additionally, one of the key elements in the UAE is the sonication temperature. In general, an elevation in this variable is correlated with increases in phenolic compound extraction yields. This is due to the breaking down of matrix bonds, increasing mass transfer, chemical solubility, and solvent diffusion velocity while decreasing solvent viscosity and tension [33]. The sonication temperature was varied from 25–75 °C. Figure 2a showed that the yield of the extraction of phenolic compounds from black cumin seeds increased markedly over the temperature range of 40–50 °C. The highest TPC yield (35.6 GAE/g dm) was obtained at 50 °C, this temperature being picked as the optimum value. As a result of the solvent molecules moving more quickly and easily at higher temperatures, the extraction of phenolic compounds increases as the extraction temperature is raised [34]. However, heat-sensitive components will be damaged if the extraction temperature is too high [35]. This could explain why TPC content dropped at temperatures higher than 50 °C.

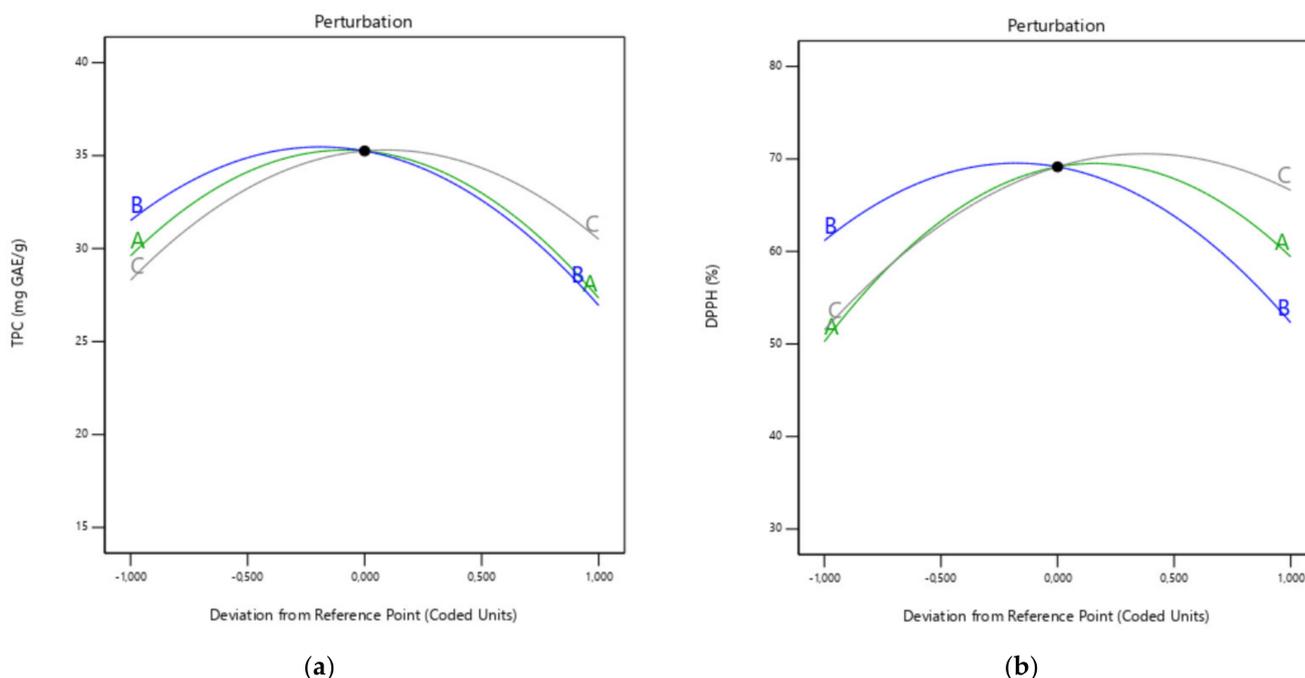


Figure 2. Perturbation plots showing the effect of extraction factors (A: ethanol concentration; B: temperature; C: extraction time) on TPC (a) and DPPH radical scavenging activity (b).

3.3. Influence of Process Variables on the DPPH Radical Scavenging Activity

According to Madhujith and Shahidi [36], phenolic compounds produced from plant sources are widely used and significant due to their ability to serve as reducing agents, free radical scavengers, and metal ion chelators to reduce and control oxidative stress. The most common technique for the evaluation of antioxidant activity in plants is the DPPH radical scavenging activity assay. For this reason, DPPH radical scavenging activity was used to examine the antioxidant potential of defatted black cumin seeds. As it can be seen in Table 1, black cumin extracts report an antioxidant activity of between 35 and 70.5%. The highest percentage of DPPH radical scavenging activity (70.5%) was presented in extract 4 (Table 1), in the conditions of 60% ethanol concentration, 50 °C temperature and 30 min of sonication duration. In addition, regression analysis using ANOVA revealed that the chosen model was very significant since the p -value was <0.0001 (Table 2). Furthermore, model coefficients illustrated that all the linear factors had a substantial impact ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) on the result. The following polynomial equation (Equation (2)) demonstrates the relationship between process factors and the antioxidant activity of the extracted compounds:

$$Y_{\text{DPPH}} = +69.15 + 12.75X_1 + 11.93X_2 + 34.53X_3 + 9.67X_1X_3 + 4.03X_2X_3 + 62.04X_1^2 + 46.66X_2^2 + 30.82X_3^2 \quad (2)$$

where Y_{DPPH} stands for the black cumin seed extract ability to scavenge DPPH radicals, and X_1 , X_2 , and X_3 stands for the ethanol concentration (%), temperature (°C), and time (min), respectively.

Three-dimensional response surface plots were also created to analyze the relationships between the experimental data of the investigated variables and the DPPH radical scavenging activity. The results demonstrated that the extraction process variables significantly affected the DPPH radical scavenging activity (Figure 3b). Even though the interaction between ethanol concentration and temperature (X_1X_2) had no effect on DPPH radical scavenging activity, it was proven that the interactions between ethanol concentration and time (X_1X_3) and between temperature and time (X_2X_3) had a significant impact (Figure 3b). As it can be seen in Figure 2b, the antioxidant activity content of the resultant extracts increased significantly in three cases: when the ethanol concentration approaches

60%, when the extraction period is extended from 15 to 30 min, and when the temperature is raised from 30 to 50 °C. According to Fadimu et al. [37], the UAE process promotes the dissolution of phenolic compounds as the ethanol concentration rises. In combinations of water and ethanol, water works as a swelling agent, whereas ethanol breaks down the links between solutes and the cellular matrix [38]. As a result, increasing the ethanol concentration would lead to the extraction of more bioactive compounds with high antioxidant activity. However, even though a 60% ethanol concentration was the optimal value, the DPPH radical scavenging activity was quickly lowered to the minimal value of 35% as the ethanol concentration increased to 90%. This phenomenon may be caused by the poor solubility of phenolic compounds in ethanol, since it appears that a larger concentration of this solvent is not appropriate for extracting more potent antioxidants due to their polarity. The same results were also observed in a study by Prasad et al. [39] as ethanol concentrations exceeded 68%. Additionally, as previously studies reported by Sahin and Samli and Tomsik et al. [38,40], when temperature rises over 60 °C, DPPH radical scavenging activity is decreasing. This reduction is a possible outcome by the breakdown of some heat-sensitive phenolic compounds in the matrix. Furthermore, according to the sonication time, TPC results were in align with DPPH radical scavenging activity, with a maximum value at 30 min, and subsequently decreased at a higher time (45 min). These mild conditions are expected since higher sonication temperatures and longer sonication times than optimal levels may decompose sensitive phenolic compounds [11]. Additionally, DPPH radical scavenging activity assay had results that were remarkably comparable to those found in previous research studies [11]. Surprisingly, the DPPH radical scavenging activity value of black cummin was significantly closer to that of date palm spikelets extract (87.2%). It was obtained at optimal UAE conditions of 40.8 °C, 21.6 min, and 50.0% ethanol–water concentration. In another study, conducted by Bouafia et al. [41], the following parameters of 38.9 min, 54.7 °C, and a ratio of 45.2 mL/0.5 g resulted in the highest antioxidant capacity for UAE model (42.17 mg AAE/g dm).

3.4. Phenolic Compound Profile

Regarding our results, the obtained regression equations revealed a linear relationship between the peak area of each polyphenolic compound and their concentration, with corresponding correlation coefficients higher than 0.995. In the meantime, RSD% values of intra and interday assays, were, respectively, in the ranges of 0.32–1.04 and 0.92–2.68. The limits of detection and quantification were in the range of 0.1–0.9 and 0.3–2.8 µg/mL, respectively, as is illustrated in Table 3. The current HPLC-UV analysis examined the possible existence of nine major polyphenols in the UAE and conventional extracts of black cummin. All the results of the detected polyphenols are expressed as mean concentration (mg/g of dry extract) ± standard deviation (Table 4). According to our findings, six polyphenols were present in the UAE sample, but only four were above the limit of quantification. The concentrations of catechin, epicatechin, caffeic acid, rutin in the UAE sample were 0.18, 1.88, 0.17 and 0.96 mg/g, respectively. On the other hand, in the case of conventional extract, quantification was possible for five compounds, while gallic acid was below LOQ as well. In addition, the catechin, epicatechin, rutin contents were 0.27, 2.37 and 1.21 mg/g, respectively. However, the caffeic acid concentration in conventional extract exhibited the same level as the UAE sample (0.17 mg/g) as indicated in Figure 4.

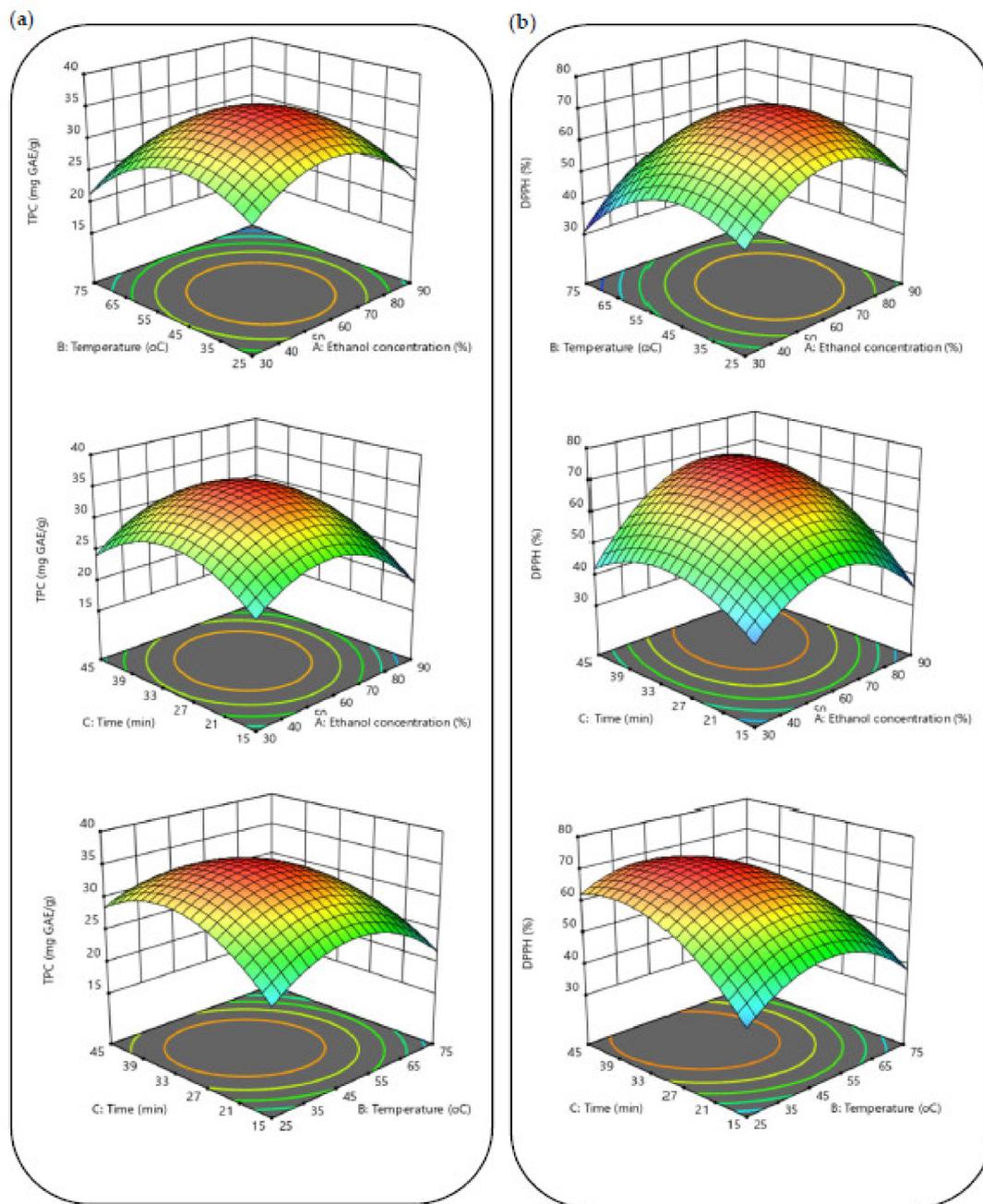


Figure 3. 3D response surface plots showing the interactive effects of process factors on TPC (a) and DPPH (b).

Table 3. Limits of detection and quantification, regression equations, retention times, repeatability and reproducibility ($n = 3$).

Compounds	Rt ± SD	Linear Range	Linear Equation	R ²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Intraday RSD _{Area} %	Interday RSD _{Area} %
Gallic Acid	2.52 ± 0.00	0.01–0.0001	y = 84073550x + 10609	0.998	0.3	0.9	1.00	0.92
Catechin	3.34 ± 0.02	0.05–0.0001	y = 13269933x - 2012	0.999	0.3	0.9	0.95	2.53
Epicatechin	3.83 ± 0.03	0.01–0.0001	y = 16600346x + 2404	0.998	0.3	0.8	1.04	1.47
Caffeic Acid	4.54 ± 0.05	0.01–0.0001	y = 55118151x + 8713	0.997	0.3	1.0	0.47	1.96
Rutin	5.54 ± 0.07	0.05–0.0001	y = 23176073x - 12698	0.998	0.9	2.8	0.55	1.80
Sinapic Acid	7.99 ± 0.06	0.01–0.0001	y = 39382578x + 2882	0.997	0.4	1.1	0.33	1.92
Quercitrin	11.49 ± 0.08	0.01–0.0001	y = 12295377x - 1169	0.999	0.1	0.3	0.42	1.84
Myricetin	13.12 ± 0.03	0.01–0.0001	y = 25427092x + 2679	0.998	0.3	0.9	0.90	2.68
Quercetin	14.67 ± 0.04	0.01–0.0001	y = 34063703x + 42715	0.998	0.3	0.9	0.32	1.67

Table 4. Concentration of the detected phenolics in black cumin expressed as mg/g of dry extract ($n = 3$).

Phenolic Compound	Conventional Technique (mg/g)	UAE Technique at Optimum Conditions (mg/g)
Gallic Acid	NQ	NQ
Catechin	0.18 ± 0.00	0.27 ± 0.00
Epicatechin	1.88 ± 0.00	2.37 ± 0.02
Caffeic Acid	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.00
Rutin	0.96 ± 0.00	1.21 ± 0.01
Sinapic Acid	ND	ND
Quercitrin	ND	ND
Myricetin	ND	ND
Quercetin	NQ	0.15 ± 0.00

ND: not detected. NQ: not quantified.

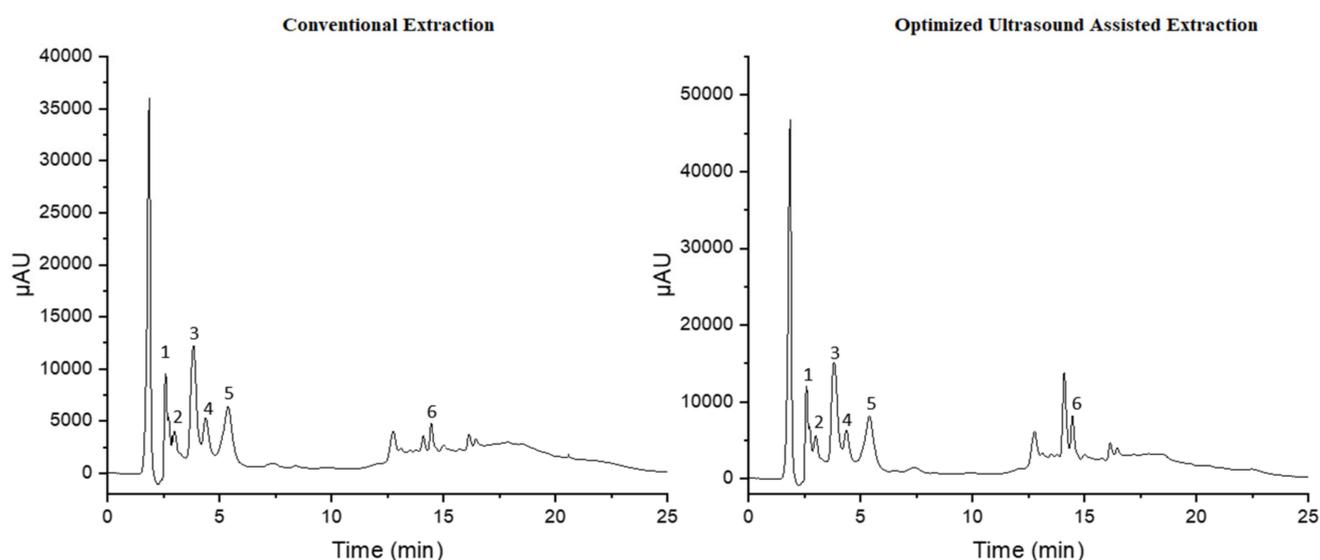


Figure 4. HPLC chromatograms of phenolic compounds for extracts obtained by conventional extraction and ultrasound-assisted extraction under the optimum conditions. (1) Gallic acid, (2) catechin, (3) epicatechin, (4) Caffeic Acid, (5) Rutin and (6) Quercetin.

Contrary to a previously published study [42] about the characterization of extracted phenolic acids and flavonoids from black cumin, quantification was possible for six compounds. Protocatechuic acid, caffeic acid, ellagic acid, ferulic acid, quercetin, kaempferol, and gallic acid were all measured at 0.13, 0.50, 0.15, 0.37, and 0.15 mg/g, respectively. In another study, by Saleha. H et al. [43], the HPLC analysis of black cumin seeds revealed the presence of chlorogenic acid, caffeic acid, kaempferol, and thymoquinone in concentrations of 5.5, 4.09, 6.02 and 5.13 $\mu\text{g/g}$, respectively. Additionally, our proof that substances such as rutin, gallic acid, and caffeic acid occur in black seeds also aligns with findings from a survey by Muzolf et al. [44]. In addition, a more recent study conducted in 2020 by Feng et al. [45] with the use of an LC-ESI-QTOF/MS system identified and quantified seven bioactive compounds, including kaempferol-3-glucoside, diosmin, quercetin, kaempferol, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, and chlorogenic acid, at concentrations of 0.39, 0.21, 1.83, 9.8, 1.39, 22.86 and 0.02 mg/g, respectively. Previous studies indicated that gallic acid, caffeic acid, quercetin, and kaempferol are the most prevalent compounds in black cumin seeds. Based on our results, caffeic acid concentration was 0.17 mg/g in both dry extracts. Gallic acid was presented in both extracts at very low concentrations, below the limit of quantification, while quercetin was not found in any of them and kaempferol was not detected. Epicatechin was the major phenolic compounds in both extracts.

3.5. Optimized Condition and Comparison with Conventional Technique

Based on the experimental and predicted data, the optimum UAE conditions were of ethanol concentration of 59.1%, extraction temperature of 44.6 °C and extraction time of 32.5 min. Under these conditions, the TPC and DPPH radical scavenging activities were 35.6 (mg GAE/g) and 70.5%, respectively. In comparison with the conventional method, the TPC and DPPH radical scavenging activities in the optimal condition of UAE increased by about 42 and 21%, respectively (Table 5). The result revealed that the use of UAE has a beneficial effect on the extraction of bioactive compounds from black cumin seed, since it is greater than that obtained by conventional techniques. These results are primarily explained by the ability of ultrasonic extraction to promote mass transfer and speed up the extraction procedure, enhancing the extraction of bioactive compounds [21]. Additionally, the UAE was a quicker, more productive, and lower-temperature extraction process for recovering phenolics from defatted black cumin seeds.

Table 5. Comparison in extraction conditions, TPC and DPPH of each technique.

Methods	Ethanol Concentration (%)	Temperature (°C)	Time (min)	TPC (mg GAE/g)	DPPH (%)	IC50 Values for DPPH (mg/mL)
UAE-optimized	59.1	44.6	32.5	35.6	70.5	1.14
Conventional	50	50	120	20.9	51.1	1.96

4. Conclusions

The findings of the current study make it abundantly evident that extraction time, temperature, and solvent concentration have a significant impact on the contents of phenolic compounds present in black cumin defatted extracts, as well as their reported antioxidant activity. The highest amount of TPC and DPPH radical scavenging activities were 35.6 mg GAE/g and 70.5%, respectively. Moreover, the UAE optimization process demonstrates a strong influence of the sonication temperature, time and ethanol concentration with optimum conditions at 44.68 °C, 32.51 min and 59.18%, respectively. Additionally, according to the HPLC-UV phenolic profile, six polyphenols were found in the conventional extract, although only four of them were above LOQ, namely catechin (0.18 mg/g), epicatechin (1.88 mg/g), caffeic acid (0.17 mg/g), and rutin (0.96 mg/g). The extract obtained by UAE at the optimum conditions had greater total phenolic content and DPPH radical scavenging activity than that extracted by conventional technique. Overall, it was established that certain polyphenols included in this matrix had significant antioxidant capacity in accordance with the screening and characterization of the polyphenolic components that were found. As a result, it is assumed that black cumin seeds can be a potential source of bioactive chemicals and phenolic components that contribute to significant antioxidant activity.

Author Contributions: Conceptualization: M.H., A.M. and A.O.; methodology, A.G., D.J.G.-S., J.C.O.-P., M.L.S.O., M.C.C., G.D.I., F.Z.K. and C.P.K.-C.; formal analysis and resources: A.G., D.J.G.-S., J.C.O.-P., M.L.S.O., M.C.C., G.D.I. and C.P.K.-C. writing—original draft preparation: A.G., D.J.G.-S., J.C.O.-P., M.L.S.O., M.C.C. and M.H.; writing—review and editing: A.M. and M.H.; supervision and validation: M.H., A.M. and A.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Yimer, E.M.; Tuem, K.B.; Karim, A.; Ur-Rehman, N.; Anwar, F. *Nigella sativa* L. (Black Cumin): A Promising Natural Remedy for Wide Range of Illnesses. *Evid. -Based Complement. Altern. Med.* **2019**, *2019*, 1528635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mohammed, N.K.; Abd Manap, M.Y.; Tan, C.P.; Muhialdin, B.J.; Alhelli, A.M.; Hussin, A.S.M. The Effects of Different Extraction Methods on Antioxidant Properties, Chemical Composition, and Thermal Behavior of Black Seed (*Nigella sativa* L.) Oil. *Evid. -Based Complement. Altern. Med.* **2016**, *2016*, 6273817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hadidi, M.; Ibarz, A.; Pouramin, S. Optimization of Extraction and Deamidation of Edible Protein from Evening Primrose (*Oenothera Biennis* L.) Oil Processing by-Products and Its Effect on Structural and Techno-Functional Properties. *Food Chem.* **2021**, *334*, 127613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gonzalez-Serrano, D.J.; Hadidi, M.; Varcheh, M.; Jelyani, A.Z.; Moreno, A.; Lorenzo, J.M. Bioactive Peptide Fractions from Collagen Hydrolysate of Common Carp Fish Byproduct: Antioxidant and Functional Properties. *Antioxidants* **2022**, *11*, 509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ozdemir, N.; Kantekin-Erdogan, M.N.; Tat, T.; Tekin, A. Effect of Black Cumin Oil on the Oxidative Stability and Sensory Characteristics of Mayonnaise. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 1562–1568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Verma Pak, N.; Biol Sci, J. A Review of Medicinal Uses and Pharmacological Activities of *Nigella sativa*. *Pak. J. Biol. Sci.* **2004**, *7*, 441–451.
7. Das, B. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Fruit Extract of *Ampelocissus Latifolia* (Roxb) on Laboratory Animals. *Br. J. Pharm. Res.* **2014**, *4*, 1477–1485. [[CrossRef](#)]
8. Majidiyan, N.; Hadidi, M.; Azadikhah, D.; Moreno, A. Protein Complex Nanoparticles Reinforced with Industrial Hemp Essential Oil: Characterization and Application for Shelf-Life Extension of Rainbow Trout Fillets. *Food Chem. X* **2022**, *13*, 100202. [[CrossRef](#)]
9. Haghani, S.; Hadidi, M.; Pouramin, S.; Adinepour, F.; Hasiri, Z.; Moreno, A.; Munekeata, P.E.S.; Lorenzo, J.M. Application of Cornelian Cherry (*Cornus Mas* L.) Peel in Probiotic Ice Cream: Functionality and Viability during Storage. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1777. [[CrossRef](#)]
10. Dordevic, T.; Antov, M. Ultrasound Assisted Extraction in Aqueous Two-Phase System for the Integrated Extraction and Separation of Antioxidants from Wheat Chaff. *Sep. Purif. Technol.* **2017**, *182*, 52–58. [[CrossRef](#)]
11. Almusallam, I.A.; Mohamed Ahmed, I.A.; Babiker, E.E.; al Juhaimi, F.Y.; Fadimu, G.J.; Osman, M.A.; al Maiman, S.A.; Ghafoor, K.; Alqah, H.A.S. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Properties from Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Spikelets Using Response Surface Methodology. *LWT* **2021**, *140*, 110816. [[CrossRef](#)]
12. Fu, X.; Wang, D.; Belwal, T.; Xie, J.; Xu, Y.; Li, L.; Zou, L.; Zhang, L.; Luo, Z. Natural Deep Eutectic Solvent Enhanced Pulse-Ultrasonication Assisted Extraction as a Multi-Stability Protective and Efficient Green Strategy to Extract Anthocyanin from Blueberry Pomace. *LWT* **2021**, *144*, 111220. [[CrossRef](#)]
13. Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M. Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *34*, 540–560. [[CrossRef](#)]
14. Zivkovic, J.; Savikin, K.; Jankovic, T.; Cujic, N.; Menkovic, N. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenolic Compounds from Pomegranate Peel Using Response Surface Methodology. *Sep. Purif. Technol.* **2018**, *194*, 40–47. [[CrossRef](#)]
15. Agregan, R.; Munekeata, P.E.S.; Feng, X.; Astray, G.; Gullon, B.; Lorenzo, J.M. Recent Advances in the Extraction of Polyphenols from Eggplant and Their Application in Foods. *LWT* **2021**, *146*, 111381. [[CrossRef](#)]
16. Yusoff, I.M.; Mat Taher, Z.; Rahmat, Z.; Chua, L.S. A Review of Ultrasound-Assisted Extraction for Plant Bioactive Compounds: Phenolics, Flavonoids, Thymols, Saponins and Proteins. *Food Res. Int.* **2022**, *157*, 111268. [[CrossRef](#)]
17. Ciric, A.; Krajnc, B.; Heath, D.; Ogrinc, N. Response Surface Methodology and Artificial Neural Network Approach for the Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from Garlic. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *135*, 110976. [[CrossRef](#)]
18. Hesami, G.; Darvishi, S.; Zarei, M.; Hadidi, M. Fabrication of Chitosan Nanoparticles Incorporated with *Pistacia Atlantica* Subsp. *Kurdica* Hulls' Essential Oil as a Potential Antifungal Preservative against Strawberry Grey Mould. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2021**, *56*, 4215–4223. [[CrossRef](#)]
19. Yancheshmeh, B.S.; Panahi, Y.; Allahdad, Z.; Abdolshahi, A.; Zamani, Z. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from *Achillea Kellalensis* Using Response Surface Methodology. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2022**, *28*, 100355. [[CrossRef](#)]
20. Hadidi, M.; Motamedzadegan, A.; Jelyani, A.Z.; Khashadeh, S. Nanoencapsulation of Hyssop Essential Oil in Chitosan-Pea Protein Isolate Nano-Complex. *LWT* **2021**, *144*, 111254. [[CrossRef](#)]
21. Bouaoudia-Madi, N.; Boulekbache-Makhlouf, L.; Madani, K.; Silva, A.M.S.; Dairi, S.; Oukhmanou-Bensidhoum, S.; Cardoso, S.M. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from *Myrtus Communis* L. Pericarp. *Antioxidants* **2019**, *8*, 205. [[CrossRef](#)]
22. Nicolaou, A.G.; Stavrou, I.J.; Louppis, A.P.; Constantinou, M.S.; Kapnissi-Christodoulou, C. Application of an Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Method for the Detection and Quantification of Cannabis in Cerumen Samples. *J. Chromatogr. A* **2021**, *1642*, 462035. [[CrossRef](#)]
23. Pereira, O.R.; Catarino, M.D.; Afonso, A.F.; Silva, A.M.S.; Cardoso, S.M. *Salvia Elegans*, *Salvia Greggii* and *Salvia Officinalis* Decoctions: Antioxidant Activities and Inhibition of Carbohydrate and Lipid Metabolic Enzymes. *Molecules* **2018**, *23*, 3169. [[CrossRef](#)]

24. Hossain, M.B.; Brunton, N.P.; Patras, A.; Tiwari, B.; O'Donnell, C.P.; Martin-Diana, A.B.; Barry-Ryan, C. Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Marjoram (*Origanum majorana* L.) Using Response Surface Methodology. *Ultrason. Sonochem.* **2012**, *19*, 582–590. [[CrossRef](#)]
25. Badwaik, L.S.; Prasad, K.; Deka, S.C. Optimization of Extraction Conditions by Response Surface Methodology for Preparing Partially Defatted Peanut. *Int. Food Res. J.* **2012**, *19*, 341–346.
26. Rohilla, S.; Mahanta, C.L. Optimization of Extraction Conditions for Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Tamarillo Fruit (*Solanum Betaceum*) Using Response Surface Methodology. *J. Food Meas. Charact.* **2021**, *15*, 1763–1773. [[CrossRef](#)]
27. Gandhi, G.R.; Ignacimuthu, S.; Paulraj, M.G. Solanum Torvum Swartz. Fruit Containing Phenolic Compounds Shows Antidiabetic and Antioxidant Effects in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 2725–2733. [[CrossRef](#)]
28. Gullon, B.; Gullon, P.; Lu-Chau, T.A.; Moreira, M.T.; Lema, J.M.; Eibes, G. Optimization of Solvent Extraction of Antioxidants from Eucalyptus Globulus Leaves by Response Surface Methodology: Characterization and Assessment of Their Bioactive Properties. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *108*, 649–659. [[CrossRef](#)]
29. Hammi, K.M.; Jdey, A.; Abdelly, C.; Majdoub, H.; Ksouri, R. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Tunisian Zizyphus Lotus Fruits Using Response Surface Methodology. *Food Chem.* **2015**, *184*, 80–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Irakli, M.; Chatzopoulou, P.; Ekateriniadou, L. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds: Oleuropein, Phenolic Acids, Phenolic Alcohols and Flavonoids from Olive Leaves and Evaluation of Its Antioxidant Activities. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *124*, 382–388. [[CrossRef](#)]
31. Medina-Torres, N.; Ayora-Talavera, T.; Espinosa-Andrews, H.; Sanchez-Contreras, A.; Pacheco, N. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy* **2017**, *7*, 47. [[CrossRef](#)]
32. Brahmi, F.; Blando, F.; Sellami, R.; Mehdi, S.; de Bellis, L.; Negro, C.; Haddadi-Guemghar, H.; Madani, K.; Makhoul-Boulekbache, L. Optimization of the Conditions for Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Opuntia Ficus-Indica [L.] Mill. Flowers and Comparison with Conventional Procedures. *Ind. Crops Prod.* **2022**, *184*, 114977. [[CrossRef](#)]
33. Katsampa, P.; Valsamedou, E.; Grigorakis, S.; Makris, D.P. A Green Ultrasound-Assisted Extraction Process for the Recovery of Antioxidant Polyphenols and Pigments from Onion Solid Wastes Using Box-Behnken Experimental Design and Kinetics. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *77*, 535–543. [[CrossRef](#)]
34. Casagrande, M.; Zanela, J.; Wagner, A.; Busso, C.; Wouk, J.; Iurckevicz, G.; Montanher, P.F.; Yamashita, F.; Malfatti, C.R.M. Influence of Time, Temperature and Solvent on the Extraction of Bioactive Compounds of Baccharis Dracunculifolia: In Vitro Antioxidant Activity, Antimicrobial Potential, and Phenolic Compound Quantification. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *125*, 207–219. [[CrossRef](#)]
35. Chew, Y.L.; Ling Chan, E.W.; Tan, P.L.; Lim, Y.Y.; Stanslas, J.; Goh, J.K. Assessment of Phytochemical Content, Polyphenolic Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Leguminosae Medicinal Plants in Peninsular Malaysia. *BMC Complement. Altern. Me.d* **2011**, *11*, 12. [[CrossRef](#)]
36. Madhujith, T.; Shahidi, F. Optimization of the Extraction of Antioxidative Constituents of Six Barley Cultivars and Their Antioxidant Properties. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8048–8057. [[CrossRef](#)]
37. Fadimu, G.J.; Ghafoor, K.; Babiker, E.E.; Al-Juhaimi, F.; Abdulraheem, R.A.; Adenekan, M.K. Ultrasound-Assisted Process for Optimal Recovery of Phenolic Compounds from Watermelon (*Citrullus Lanatus*) Seed and Peel. *J. Food Meas. Charact.* **2020**, *14*, 1784–1793. [[CrossRef](#)]
38. Sahin, S.; Samli, R. Optimization of Olive Leaf Extract Obtained by Ultrasound-Assisted Extraction with Response Surface Methodology. *Ultrason. Sonochem.* **2013**, *20*, 595–602. [[CrossRef](#)]
39. Prasad, K.N.; Hassan, F.A.; Yang, B.; Kong, K.W.; Ramanan, R.N.; Azlan, A.; Ismail, A. Response Surface Optimisation for the Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacities of Underutilised Mangifera Pajang Kosterm. Peels. *Food Chem.* **2011**, *128*, 1121–1127. [[CrossRef](#)]
40. Tomsik, A.; Pavlic, B.; Vladic, J.; Ramic, M.; Brindza, J.; Vidovic, S. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Wild Garlic (*Allium Ursinum* L.). *Ultrason. Sonochem.* **2016**, *29*, 502–511. [[CrossRef](#)]
41. Bouafia, M.; Colak, N.; Ayaz, F.A.; Benarfa, A.; Harrat, M.; Gourine, N.; Yousfi, M. The Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Centaurea Sp. Antioxidative Phenolic Compounds Using Response Surface Methodology. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2021**, *25*, 100330. [[CrossRef](#)]
42. Ani, V.; Varadaraj, M.C.; Naidu, K.A. Antioxidant and Antibacterial Activities of Polyphenolic Compounds from Bitter Cumin (*Cuminum nigrum* L.). *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *224*, 109–115. [[CrossRef](#)]
43. Hameed, S.; Imran, A.; Nisa, M.U.; Arshad, M.S.; Saeed, F.; Arshad, M.U.; Asif Khan, M. Characterization of Extracted Phenolics from Black Cumin (*Nigella sativa* Linn), Coriander Seed (*Coriandrum sativum* L.), and Fenugreek Seed (*Trigonella Foenum-Graecum*). *Int. J. Food Prop.* **2019**, *22*, 714–726. [[CrossRef](#)]
44. Muzolf-Panek, M.; Stuper-Szablewska, K. Comprehensive Study on the Antioxidant Capacity and Phenolic Profiles of Black Seed and Other Spices and Herbs: Effect of Solvent and Time of Extraction. *J. Food Meas. Charact.* **2021**, *15*, 4561–4574. [[CrossRef](#)]
45. Feng, Y.; Dunshea, F.R.; Suleria, H.A.R. LC-ESI-QTOF/MS Characterization of Bioactive Compounds from Black Spices and Their Potential Antioxidant Activities. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 4671–4687. [[CrossRef](#)]