

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE PROTEOMICS ET SANTE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

SPECIALITE : BIOLOGIE

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE ET MOLECULAIRE

PRESENTEE PAR MR. HADJAZI DJILALI

Thème

**Activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite  
à partir de produits cosmétiques à base d'huile végétale de  
*Nigella sativa* (la nigelle)**

Soutenu le : 17/02/2016

Devant le Jury composé de :

Président :

Mr. BENALI Mohamed

Professeur

Université de Sidi Bel Abbés.

Examineurs :

Mr. BELABID Lakhdar

Professeur

Université de Mascara.

Mr. BACHIR RAHOU Ghalem Maître de conférences A Université de Mascara.

Directeur de thèse :

Mr. ABOUNI Bouziane

Professeur

Université de Sidi Bel Abbés.

Année universitaire 2015/2016

# **INTRODUCTION**

## Introduction

La médecine dite *alternative* qui prône le soin *naturel* connaît un essor de plus en plus grandissant. L'intérêt pour les plantes médicinales, qui a reculé pendant une longue période devant le développement du génie chimique et de l'industrie de synthèse, revient en force dans le domaine de la recherche et prouve l'efficacité des plantes et des huiles essentielle (HE).

Les plantes, qui ont déjà fourni à la médecine des molécules thérapeutiques majeures telles que l'aspirine, la morphine, la quinine ou le taxol, offrent un véritable potentiel pour la recherche de molécules à activité antibactérienne.

Elles synthétisent de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules « bioactives » antimicrobiennes. L'originalité de ce système de défense réside dans l'exceptionnelle variabilité chimique des molécules produites (**Gibbons, 2008**). Ces dernières constituent, de par la diversité des groupements structuraux et fonctionnels qu'elles arborent, un vaste réservoir de substances actives. Les huiles essentielles n'ont pas tout à fait les mêmes indications que les plantes dont elles sont issues, leur effet calmant, en font des remèdes de tout premier choix.

Depuis une vingtaine d'années, on assiste à un intérêt croissant, tant dans les pays développés que dans les pays en développement, pour les systèmes traditionnels de médecine et en particulier pour les médicaments à base de plantes. Le marché des plantes médicinales est en expansion rapide et génère des bénéfices conséquents. Selon le secrétaire de la convention sur la diversité biologique, les ventes mondiales de médicaments à base de plantes sont montées à environ 60 milliards de dollars en l'an 2000.

Parmi les plantes les plus utilisées et en particulier par les populations arabomusulmanes on peut citer la nigelle. L'évolution vertigineuse de la consommation de l'essence de graines de *Nigella sativa* pour ses vertus médicinales par une branche importante de la population pour le traitement d'une multitude de maladies, a provoqué une production importante de cette graine et de son essence dans plusieurs pays du monde (**Khan, 1999**). Cette graine possède un très large domaine d'utilisations en médecine traditionnelle qui a fait l'objet de plusieurs études pharmacologiques (**Goreja, 2003**). Il a été considéré que la plupart des activités anti

infectieuses et pharmacologiques attribuées à *N. sativa* provenaient de son huile essentielle. C'est pourquoi dès 1960 des études ont été entreprises sur les constituants de cette huile volatile (**Mahfouz et al., 1960**).

C'est la haute teneur en principes actifs tels que la thymoquinone le thymol, la thymohydroquinone, le carvacrol, et le p-cymène qui a contribué à étudier son effet dans plusieurs domaines médicaux tels que la cancérologie l'activité gastrique, l'activité antidiabétique, l'effet anti-inflammatoire et en bactériologie (**Hajhashemi et al., 2004**).

Il s'ensuit que l'innocuité et la qualité de ces produits sont maintenant des questions qui intéressent de plus en plus les autorités sanitaires comme le public. L'utilisation de ces huiles représente pour le praticien une alternative thérapeutique satisfaisante lorsqu'elle s'appuie sur des données objectives.

C'est dans cette optique que se situent nos investigations sur l'étude de deux produits cosmétiques à base d'huile végétale de nigelle. Le premier produit est de production algérienne, commercialisé sous le nom « Miracle ». Le second produit est de production saoudienne et commercialisé sous le nom de « Abou Jamel ».

L'objectif de notre travail vise à vérifier la présence des principes actifs (Huiles essentielles, flavonoïdes, alcaloïdes et saponosides) dans les huiles végétales, commercialisées comme étant des produits phytothérapeutiques.

A cet effet, notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction, la séparation, la caractérisation et la quantification de ces métabolites par l'utilisation de différentes techniques telles que examen phytochimique de la graine, étude physico-chimique de l'huile essentielle et une caractérisation chromatographique et spectroscopique des huiles essentielles extraites de *N. sativa*. Le second aspect est focalisé sur l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites des produits cosmétiques à base d'huile végétale.

Dans ce manuscrit la partie bibliographique est divisée en trois sous-chapitres : Le premier sous-chapitre est réservé sur la présentation de la plante.

Le deuxième sous-chapitre est réservé la composition chimique de la graine et de l'huile essentielle.

Le troisième sous-chapitre présente les propriétés anti-infectieuses et thérapeutiques de la graine et de l'huile essentielle.

La seconde partie de ce travail « Matériel et méthodes » se focalise sur l'analyse physico-chimique de la plante par la détermination de l'humidité, de la matière sèche, de la matière organique et de la matière minérale de la graine. En deuxième temps l'extraction de l'huile essentielle à partir de l'huile fixe commercialisée est réalisée. La troisième étape concerne l'isolement et l'identification d'un certain nombre de souches bactériennes pathogènes et la mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Nigella* par les tests de l'aromatogramme et de l'antibiogramme.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu liquide, la concentration minimale bactéricide (CMB) sur milieu de culture gélosé ainsi que la concentration minimale fongicide (CMF) ont été effectuées.

L'huile essentielle récupérée à partir de l'hydrolat a fait l'objet d'analyse antibactérienne avec des résultats très intéressants.

La dernière étape concerne l'étude du suivi de la cinétique de croissance bactérienne en présence et en absence des huiles essentielles de la nigelle et le dosage des protéines produites chez les souches testées.

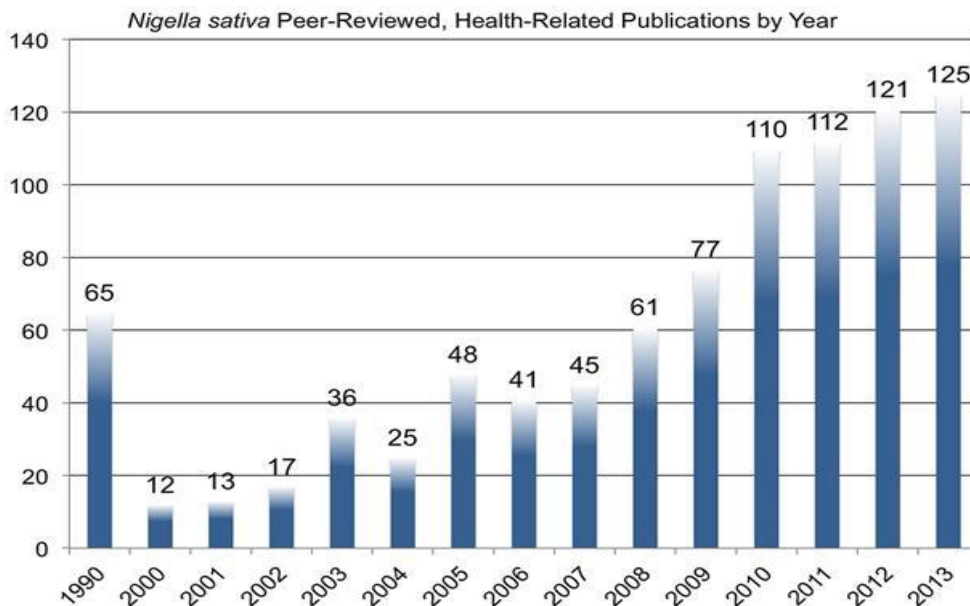
La troisième partie est réservée aux discussions des résultats obtenus dans le cadre ce travail réalisé. La dernière partie de ce travail est une conclusion générale et les perspectives de ce travail.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

# 1 LA NIGELLE

## 1.1 Présentation

La Nigelle est une plante de grande notoriété, surtout à l'échelle du monde arabe, souvent mentionnée comme étant une panacée. Sa renommée en tant que plante médicinale et condimentaire dans les pays allant du Proche au Moyen Orient remonte à plusieurs siècles. Parmi les plantes médicinales les plus connues, les plus utilisées et qui ont suscité un grand intérêt dans les pays asiatiques et méditerranéens, on trouve *Nigella Sativa* L. Avec 530 citations (livres, revus, publications) on peut comprendre l'intérêt que tient cette plante. Les résultats publiés par le département de l'information et bibliothéconomie de l'université du Koweït, maintient l'argumentation du volume de la littérature à partir de 1971, on a pu recenser jusqu'à 46 documents par an au cours de la fin des années 1990. Un petit noyau d'auteurs a contribué au tiers des citations. Quatre cinquième des citations sont le résultat d'équipes. L'Inde et l'Egypte sont les principaux contributeurs à cette littérature suivie de la Turquie du Pakistan et des pays du Maghreb (Mumtaz, 2005).



**Figure 1 :** Présentation des travaux réalisés sur l'évolution des effets pharmacologiques de *N. sativa* au cours des dernières années.

## 1.2 L'espèce *Nigella sativa*



**Figure 2 :** Présentation de la fleur de *Nigella sativa*, avec différentes couleurs

### 1.2.1 Description botanique

C'est une plante annuelle, herbacée, de 50 cm de hauteur. La tige est dressée, rameuse, côtelée et anguleuse. Les feuilles sont divisées en lobes étroits, allongés, souvent un peu élargis à leur sommet. Elles sont multifides, les feuilles inférieures sont pétiolées et les supérieures sessiles.

#### ■ La fleur

La floraison a lieu le mois d'avril à juin, dont les fleurs sont assez petites, de 2-2,5 cm de diamètre avec l'absence d'involucre sous la fleur, qui peuvent être de couleurs variées.

#### ▪ Le calice

5 sépales blancs à pointe verdâtre ou bleuâtre de forme ovale, rétrécis à la base et portent quelques poils épars sur le dos.

#### ▪ La corolle

Elle est blanche mêlée de bleu clair ou de vert de 5 à 8 pétales, plus petits que les sépales et très peu pubescents. Les pétales sont en forme de cornet à deux lèvres portant chacun au sommet deux petits renflements arrondis, non amincis à la base, et ont un onglet nectarifère.



- **Les étamines**

Elles ont une longueur de 1,5 cm de couleur jaune avec l'absence de pointe à leur sommet (mutiques).

- **Le gynécée :** Il est composé de 3 à 6 carpelles lisses, soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants.

**Le fruit :** Les fruits sont des follicules soudés, s'ouvrant au sommet par une fente interne. La surface du fruit mûr est ridée en travers sur le milieu de chaque carpelle.

**La graine :** Les graines sont noires, nombreuses et granuleuses, de 1,5 à 2 mm de longueur et disposées sur deux rangs. Leur forme est pyramidale, à faces triangulaires sensiblement planes, marquées de rides transversales et finement chagrinées. Les amandes sont blanches et huileuses. Lors du broyage, elles dégagent une odeur fortement aromatique, tenant du poivre et de l'anis et aussi de la noix de muscade. **(Benyoussef *et al.*, 2001 ; Wichtl et Anton, 2003).**

### 1.2.2 Historique

Depuis la plus haute antiquité, les peuples du Proche-Orient connaissent et apprécient la *Nigella sativa* comme assaisonnement et plante médicinale.

- **Babylone :** les sources babyloniennes anciennes renvoient à diverses plantes servant à aromatiser la nourriture. Bien que l'identification soit particulièrement difficile, l'épice *zibûm* est classé comme étant *Nigella sativa* **(Gwendolyn, 2007).**
- **Égypte antique:** les premiers témoignages de la culture de la nigelle dans l'Égypte antique date du XIV<sup>e</sup> siècle avant notre ère. Les couronnes florales déposées sur la momie du roi Toutankhamon ont attesté la culture de la nigelle. L'huile de cumin noir est réputée avoir des vertus calmantes, régénérantes et vitalisantes **(Ghedira, 2006).**
- **Monde gréco-romain.** Le cumin noir (*mélanthium*) fait partie des nombreuses plantes utilisées par Hippocrate (tome VII, La nature de la femme) dans ses préparations. Au premier siècle, Pline a indiqué que la nigelle, « appelée par les Grecs tantôt *mélanthium* tantôt *mélaspermon*, guérit les fluxions nasales, pilée, mise dans un linge et respirée; les maux de tête, en lotion dans du vinaigre.

- Avicenne, le médecin persan du X<sup>e</sup> siècle, dans son ouvrage « Canon de la médecine » (Kitab Al Qanûn fi Al-Tibb) a indiqué de nombreuses utilisations de la nigelle (ou *chounèse*), comme le traitement des verrues et du vitiligo ou en cas de grippe, l'application de la graine broyée sur le front du malade (**Goreja, 2003**).

### 1.2.3 Origine

La nigelle est originaire de l'Asie occidentale, sa culture s'est propagée jusqu'en Afrique et en Amérique. Elle est très répandue en Inde au Pakistan en Iraq et dans certains pays méditerranées, notamment l'Egypte, la Syrie, la Turquie et les pays de l'Afrique du nord (**Wichtl et Anton, 2003**).

### 1.2.4 Etymologie

Le terme *nigelle* est emprunté au bas latin *nigella*, féminin substantivé du latin *nigellus* « noirâtre », dérivé diminutif de *niger* « noir », d'après la couleur des graines. Le nom d'espèce *sativa* vient du latin et signifie « cultivé» (**Hegi, 1975**).

### 1.2.5 Famille des renonculacées

La renonculacées est l'une des grandes familles des angiospermes avec 40 à 50 genres et 1500 à 2000 espèces. Le genre *Nigella sativa* comporte 25 espèces réparties en Europe, en Asie occidentale et en Afrique du Nord. Répandues à peu près sur tout le globe. Les renonculacées sont considérées comme l'une des plus anciennes familles parmi les angiospermes. Cette famille comporte des espèces d'aspect très variable (arbrisseaux, arbustes etc. (**Guignard, 2001**).

### 1.2.6 Identification et aspect botanique

La nigelle possède trois noms latins

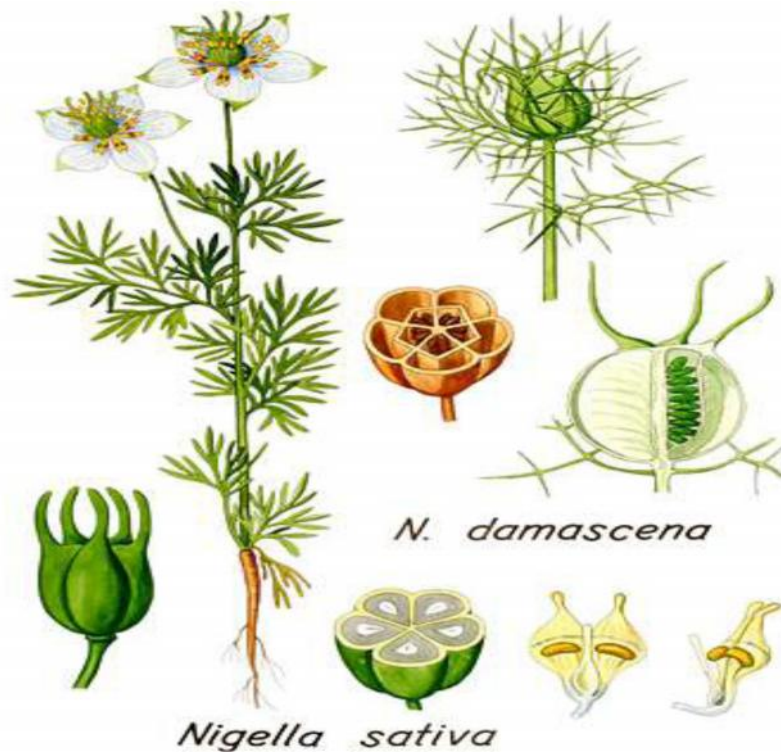
*Cuminum nigrum*

*Nigella indica*

*Nigella sativa*

Ce sont des noms dérivés du latin "Niger" qui signifie noir,

### 1.2.7 Position systématique



**Figure 3 :** *Nigella sativa* (à gauche), *N. damascena* (à droite)

- |                             |   |
|-----------------------------|---|
| ➤ <b>Sous-règne</b>         | <b>CORMAPHYTE</b>                               |
| ➤ <b>Embranchement</b>      | <b>SPERAPHYTR</b>                               |
| ➤ <b>Sous-embranchement</b> | <b>ANGIOSPERME</b>                              |
| ➤ <b>Classe</b>             | <b>EUDICOTYLEDONE</b>                           |
| ➤ <b>Sous-classe</b>        | <b>AUDICOTS ARCHAQUES</b>                       |
| ➤ <b>Ordre</b>              | <b>RANONCULALES</b>                             |
| ➤ <b>Famille</b>            | <b>RENONCULALEES</b>                            |
| ➤ <b>Sous-famille</b>       | <b>HELOBOROIDEES</b>                            |
| ➤ <b>Genre</b>              | <b>NIGELLA</b>                                  |
| ➤ <b>Espèce</b>             | <b><i>NIGELLA SATIVA</i> (Guignard, 2001) .</b> |

### **1.2.8 Caractéristiques des graines**

Les graines sont ovoïdes de 2 à 3,5 mm de longueur, présentent 3 à 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée (**Ghedira, 2006**).

#### **1.2.8.1 Odeur**

la graine broyée dégage une forte odeur aromatique qui rappelle l'anis, la noix de muscade et le poivre (**Wichtl et Anton, 2003**). D'autres auteurs évoquent l'odeur du citron et du saffran (**Benyoussef et al., 2001**).

#### **1.2.8.2 Saveur**

Elle est en premier lieu légèrement amère, puis épicée et un peu acre (**Fabienne, 2005**).

### **1.2.9 Utilisation en médecine traditionnelle**

Les médecins Musulmans et Arabes se sont doublement préoccupés de la graine de nigelle après l'avoir connue dans la tradition Prophétique. Avicenne a consacré un chapitre sur la nigelle, « *chounèse* », dans son *Canon de la médecine*, « *Kitab Al Qanûn fi Al-Tibb* ». Les graines sont utilisées comme remède traditionnel ou comme épice dans de nombreux pays du monde et particulièrement dans le monde musulman. Rapportée dans deux Sahîhs et dans la médecine prophétique de Ibn Qayyim al-Jawziyya, une communication orale du prophète de l'Islam aurait indiqué à propos de la nigelle : « Utilisez la graine noire car elle guérit tous les maux, excepté la mort ». Les graines de nigelle servent en Egypte à la production notamment d'une huile utilisée contre les problèmes de peau.

### 1.2.11 Synonymes et dénominations internationales

**Tableau 1** : Synonymes et dénominations internationale.

PAYS	DENOMINATIONS
EGYPTE	Habbet el Baraka - <i>Kamoun-Aswad</i>
ALGERIE	Essanouj
LIBYE	Al-Kamoun
MAROC	Habbah-Saouda
IRAN	Al-Shouniz
FRANÇAIS	Cumin Noir-NiellPoivrette-Nigelle-Cheveux de vénus.
ESPAGNOL	Nègilla – Sanuj - Aranuela - cultivada – Barba d'Erwita.
ANGLAIS	Black Caraway - Onion seed - Garden Nigelle -Fennel Flower.
ALLEMAND	Nigellensamer - Schwarz Kümmel - Schwarzer Kreuzkümmel - Schwarzer Römischer Koriander.

### 1.2.12 Toxicité de *Nigella sativa*

La toxicité de la nigelle est bien connue par la plupart des herboristes. En effet, elle est utilisée en faible dose, quelque soit la voie d'utilisation interne, externe, en fumigation ou en inhalation. Un surdosage des graines de *Nigella sativa* peut être mortel et peut provoquer des avortements (**Zaghlol et al., 2012**). Cette toxicité comme celle de la plupart des espèces de la famille des renonculacées, est due exclusivement à la présence de fortes quantités de saponines et d'alcaloïdes (**Das et al., 2010**).

La plupart des études effectuées sur la toxicité de *Nigella sativa* ont montré clairement que cette plante possède un index thérapeutique très élevé avec une excellente innocuité à des doses inférieures à 4g/kg/j. L'administration par voie orale d'huile de graines de *Nigella sativa* à des doses allant jusqu'à 10ml/kg chez le rat n'entraîne pas de mortalité durant une période d'observation de 48 heures (**Zaoui et al., 2002**).

L'administration à forte dose (2g/kg de poids corporel) entraîne chez l'animal une hypoactivité et une difficulté respiratoire. La DL50 en thymoquinone est estimée à 2,4g/kg. Les graines de nigelle sont largement consommées comme épice et comme plante médicinale, Seules la thymoquinone et l'huile essentielle possèdent une toxicité chez la souris en injection intrapéritonéale. (**Fabienne, 2005**).

## 2 Composition chimique de la graine et de l'HE de Nigelle

### 2.1 Composition chimique de la graine

La composition chimique des graines de *Nigella sativa* et ses extraits huileux varie en fonction des régions géographiques, des techniques de culture, de récolte, de stockage, des procédés d'extraction des huiles fixes et volatiles et aussi en fonction des techniques d'analyse utilisées par les laboratoires. Bien qu'une huile essentielle puisse contenir un grand nombre d'éléments biochimiques, les molécules les plus fréquemment rencontrées sont ; les terpènes, les alcools, les cétones, les aldéhydes, les esters et les éthers. Ces molécules peuvent agir en synergie, ce qui explique à la fois leur efficacité, et leur polyvalence, L'ensemble de leurs constituants se caractérise par un faible poids moléculaire (**Tableau 2**).

**Tableau 2** : Composition chimique de la graine de *N. sativa* (Aboutabl, 1985).

Constituants	Pourcentage
Lipide	33 à 38 %
Glucides	33 à 34%
Proteines	06 à 19,9%
Fibres brutes	07,94%
Humidité	05 à 07%
Cendres	03,7 à 07%

#### 2.1.1 Les Lipides

Les huiles fixes ou huiles grasses représentent entre 33,9 et 40% du poids de la graine, constituées principalement de :

Lipides neutres 96 à 97%.

Lipides polaires 3%.

Phospholipides 0,3 à 1,5% (**Ramadan et Mörsel, 2002**).

Les graines de *N. sativa* renferment environ 0,4 à 2,5% d'huile essentielle avec plus de 30% d'huiles fixes et 38% de lipides totaux dont les phospholipides (**Hashim et El-kiey, 1962**). Les acides oléique et linoléique sont les deux acides gras majeurs de l'huile de *N. sativa*. (**Martin et al., 2001**) ont rapporté que les graines de la Nigelle contiennent 26,6% d'huiles, dont 64,6% d'acide linoléique et 20,4% d'acide palmitique. La valeur énergétique de 100 g d'huile fixe est environ 900 kcal soit 3700 kJ /100 g) (**Tableau 3**).

**Tableau 3 :** Composition des graines *N. sativa* en acides gras selon l'origine de l'échantillon (**Houghton, 1995**).

Acide gras	Origine de la graine		
	Ethiopie (%°)	Inde(%)	Syrie (%°)
Linoléique	58	54,68	54,13
Oléique	23,46	25,67	24,51
Palmitique	12,07	13,15	14,64
Stéarique	2,7	2,97	2,6
Eicosadiénoïque	2,87	2,39	3,02
Linoléinique	0,47	0,68	0,69
Arachidique	0,2	0,25	0,2
Myristique	0,21	0,2	0,22
Saturés totaux	15,18	16,57	17,66
Insaturés totaux	84,82	83,43	82,34

Une étude complémentaire sur les glycolipides de *Nigella sativa* a permis de caractériser et d'identifier six composés, dont le plus abondant est le digalactosyl-diacyl glycérol qui couvre 55,6% des glycolipides totaux. Par ailleurs, l'analyse phytochimique des graines de *Nigella sativa* a permis de mettre en évidence la présence de dix acides gras libres, avec 83,7% d'acides gras insaturés (AGI) et 16,3% d'acides gras saturés (AGS) (**Babayán et al., 1978**). L'acide linoléique représente plus de 54% des acides gras totaux et l'acide oléique (23,58%). Cependant, les deux acides grassaturés majeurs sont l'acide palmitique (11,90) et l'acide stéarique (2,28%).

### 2.1.2 Les stérols

Les stérols présents dans la graine de nigelle représentent environ 2% de l'huile fixe. La plupart stérols se retrouvent sous forme estérifiée et libre.

Le sitostérol est le stérol majeur rencontré représente environ 60% des stérols, le stigmastérol environ 20% et le cholestérol à l'état de traces à une concentration de 1% (El-Tahir *et al.*, 2003).

### 2.1.3 Les protéines

Les graines de *Nigella sativa* sont très riches en protéines, environ 16% du poids de la graine avec dominance de l'acide glutamique (22,4%), l'acide aspartique (10,05%) et arginine (9,18%) L'analyse des acides aminés de l'hydrolysate de ces protéines a révélé la présence de 17 AA y compris les 8 acides aminés essentiels (El-Obeid *et al.*, 2006).

**Tableau 4 :** Composition en acides aminés essentiels de *Nigella sativa* (Fabienne, 2005).

Acides aminés	Teneur (mg/100g)
Leucine	665 ± 3,51
Valine	527 ± 3,28
Lysine	462 ± 4,28
Thréonine	417 ± 3,31
Phénylalanine	413 ± 2,67
Isoleucine	395 ± 2,11
Histidine	383 ± 1,64
Méthionine	188 ± 0,37



**Tableau 5 :** Composition en acides aminés non essentiels de *N. sativa* (Fabienne, 2005).

Acides aminés non essentiels	Teneur (mg /100g)
Acide glutamique	2829 ± 19,34
Arginine	1051 ± 10,39
Acide aspartique	1022 ± 9,80
Glycine	642 ± 4,42
Proline	560 ± 3,91
Sérine	493 ± 4,11
Alanine	427 ± 3,35
Tyrosine	411 ± 2,95
Ammonium	325 ± 2,21
Cystine	224 ± 1,82

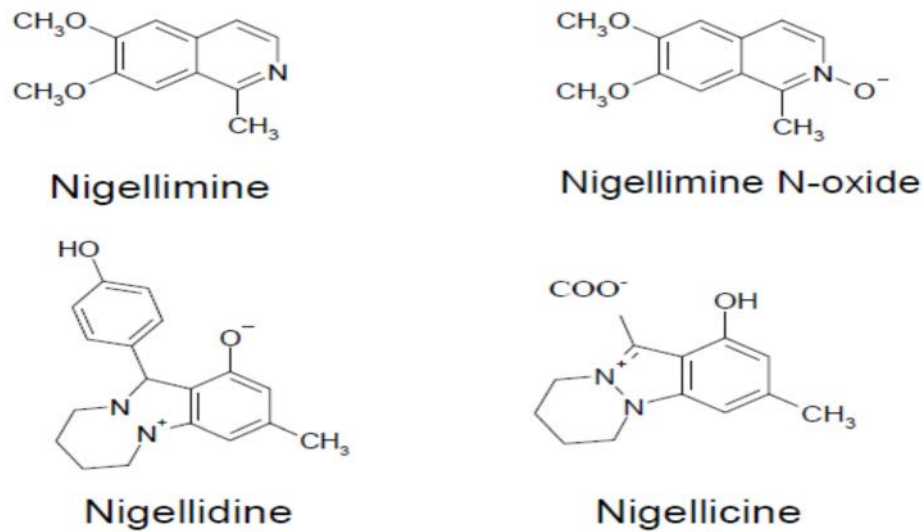
#### 2.1.4 Les glucides

La nigelle comme toutes les plantes sont des êtres vivants qui utilisent la matière minérale et l'énergie du soleil pour produire de la matière organique. Ce processus permet à la plante de synthétiser dans une première étape des hydrates de carbones (les glucides). Ces glucides de faibles poids moléculaires (oses) sont utilisés pour la synthèse de métabolites primaires nécessaires pour la survie. Il s'agit de glucides complexes (l'amidon, la cellulose, les pectines (Bruneton, 2009)).

#### 2.1.5 Les alcaloïdes

*Nigella sativa* caractérisée par la production 12 alcaloïdes est qualifiée comme étant plante à alcaloïdes. *Nigella sativa* constitue un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (Stöckigt *et al.*, 2002 ; Bruneton, 1999). Un nombre important est toxique et souvent responsable d'intoxications aiguës, aconitine, strychnine, etc (Bruneton, 2005 ; Das *et al.*, 2010).

les alcaloïdes trouvent de nombreuses applications pharmaceutiques chez l'homme (McCalley, 2002).



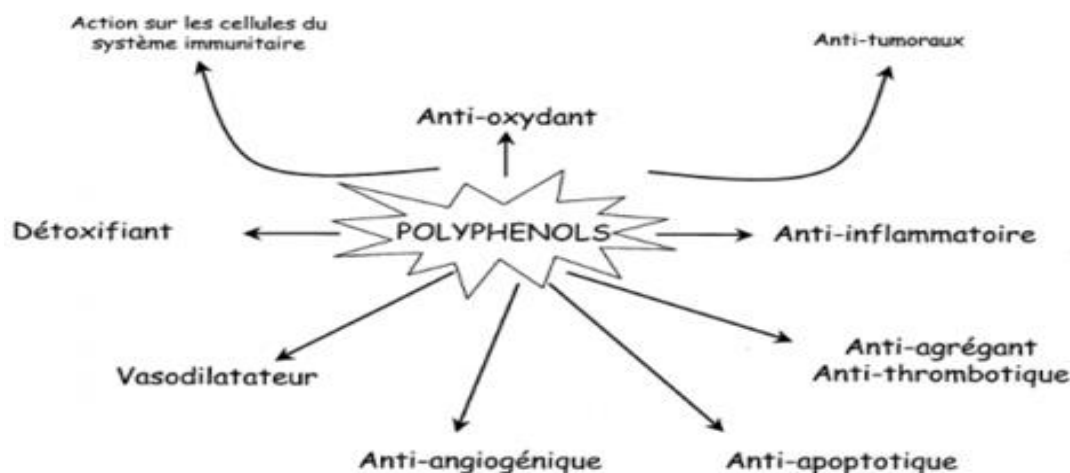
**Figure 4 :** Structure de quatre alcaloïdes (Atta, 1995).

### 2.1.6 Les polyphénols

Les polyphénols attirent de plus en plus l'attention des chercheurs et des industriels en raison de leur importance (Charrouf et Guillaume, 2007 ; Hilali, 2008). Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (Gee et Johnson, 2001). Les polyphénols, forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels. Les spécialistes classent les polyphénols en fonction de leur mode de biosynthèse et de leur structure. Ils sont divisés en plusieurs catégories, les flavonoïdes représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (Gee et Johnson, 2001 ; Dacosta, 2003).

Les composés phénoliques possèdent de nombreuses activités biologiques dont des activités antimicrobiennes (Rivera *et al.*, 2011 ; Basli *et al.*, 2012). Ces composés ont montré des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (Babar *et al.*, 2007), anti-allergènes, vasodilatateurs (Falleh *et al.*, 2008) et antioxydants (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006). Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont

également en étude clinique comme des anti-agrégant plaquettaire, ou hypotenseur sans résultats probants (Martin et Andriantsitohaina, 2002).



**Figure 5** : Effets biologiques des polyphénols (Martin *et al.*, 2002).

### 2.1.7 Les flavonoïdes

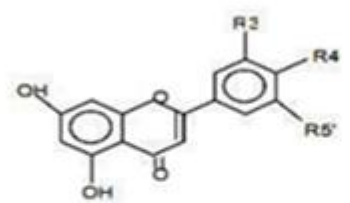
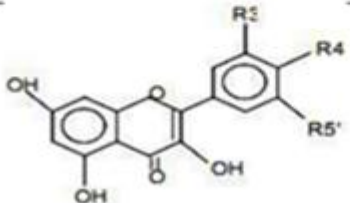
Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes et occupent une place prépondérante dans le groupe des phénols des plantes. 2 % environ du carbone organique est photosynthétisé par les plantes, avec une production annuelle de  $10^9$  tonnes par an sont convertis en flavonoïdes (Lhuillier, 2007 ; Seyoum *et al.*, 2006).

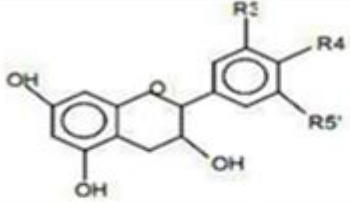
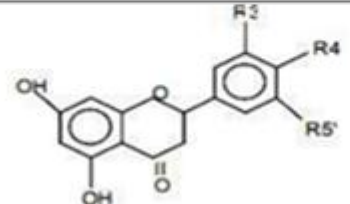
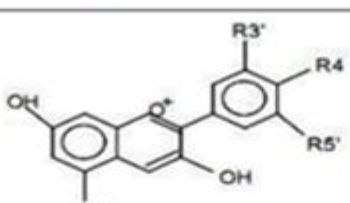
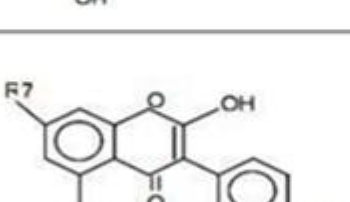
De nombreux flavonoïdes présents dans produits de consommation présentent un intérêt d'un point de vue de la santé humaine et font l'objet de nombreuses allégations concernant la santé, particulièrement de par leur caractère anti-oxydant (Lamy et Beliveau, 2002 ; Surh, 2003).

Parmi les flavonoïdes, les anthocyanes et les flavonols sont des sous-classes particulièrement intéressantes. Les propriétés thérapeutiques, cosmétiques et alimentaires ont fait l'objet de nombreuses publications et brevets (Tableau 7) (Harborne *et al.*, 2000 ; Havsteen, 2002).

les flavonoides ont une activité antibactérienne contre la croissance de nombreuses bactéries telles que *Staphylococcus aureus* (Babayi, 2004), *Escherichia coli* (Ulanowska, 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* (Okigbo, 2005 ; Mamatha, 2005).

**Tableau 7 : Structures de base des principaux flavonoïdes (Harborne et Williams, 2000).**

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH <sub>3</sub>	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine

Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

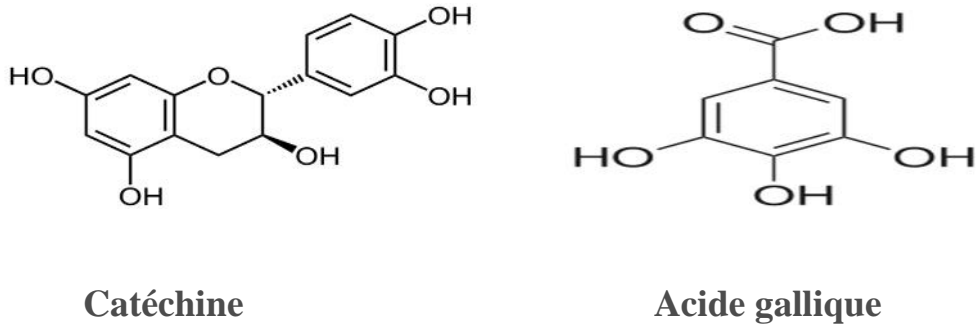
### 2.1.8 Les saponosides

Les saponosides possèdent à la fois trois types de propriétés : moussantes, hémolytiques et ichtyotoxiques. La biosynthèse des saponosides est caractéristique d'environ 80 familles végétales. Leur utilisation est variée : dans les domaines veinotonique, anti-thrombotique, antiparasitaire, antifongique, analgésique, sédatif, psychotrope immunomodulateur et cytotoxique (**Taskin et al., 2005**). Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de tri-terpène. Ce sont des composés très répandus dans le règne végétal. Les saponosides forment une classe particulière de terpénoïdes constituée d'hétérosides de triterpènes (ou de stérols). Les saponosides sont solubles dans l'eau, libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine (ou aglycone), forment une solution moussante. La première saponine de *Nigella sativa* est isolée au XIX<sup>e</sup> siècle par **Greenisch 1880 ; Kumara et Huat, 2001**). La graine de Nigelle renferme plusieurs saponosides dont l'aglycone est toujours l'hédérégénine. Ces saponosides peuvent contenir 2, 3 ou 6 sucres (**Taskin et al., 2005**).

### 2.1.9 Les tanins

*Tanin* dérive de *tan* par le suffixe *-in*. Le tan est la poudre extraite de l'écorce du chêne qui sert à tanner les peaux. Il y aurait actuellement un *millier de tanins naturels* dont la structure aurait été déterminée de manière non ambiguë (**Karamali et al., 2001**).

Les tanins sont capables de former des complexes avec les macromolécules et particulièrement avec les protéines, utilisés par voie externe contre certaines maladies inflammatoires de la peau et des muqueuses. Propriétés pharmacologiques et astringents (provoquent la contraction des tissus et des vaisseaux sanguins et qui stimulent la coagulation du sang), anti-diarrhéiques (ralentit le péristaltisme intestinal), antiseptique, vasoconstricteur de petits vaisseaux (hémorroïdes, blessures superficielles), anti-inflammatoire dans les cas de brûlures. Les tannins ont une action antibactérienne contre la croissance des bactéries ruminales telles que *Clostridium aminophilum*, *Butyvirbio fibrisolvens*, *C.proteoclasterium* (**Leitao, 2005 ; Chatterjee et al. 2004, Sivakumaran, 2004**).



**Figure 6 :** Structure chimique de deux molécules de tanins.

### 2.1.10 Les minéraux

**Al-Saleh et ses collaborateurs (2006)** ont rapporté que la composition minérale de la graine de *Nigella sativa* a révélé la présence d'une importante teneur en potassium est importante (1,18%) du poids total de la graine. phosphore (0,6 %) ; sodium (0,1 %) et fer ; le zinc ; calcium (0,5-1 %) ; magnésium ; manganèse et cuivre ont été trouvés en quantités inférieures (**Al-Saleh et al., 2006 ; Peter , 2004 ; Weiss, 2002**).

**Tableau 7:** Composition minérale des graines de *Nigella sativa* (**Takruri, 1998**).

Composition	Teneur en mg/100 g
Potassium	527,70 ± 47,70
Phosphore	526,50 ± 30,16
Sodium	49,60 ± 6,13
Fer	10,50 ± 1,56
Zinc	6,04 ± 0,38
Calcium	185,90 ± 18,27

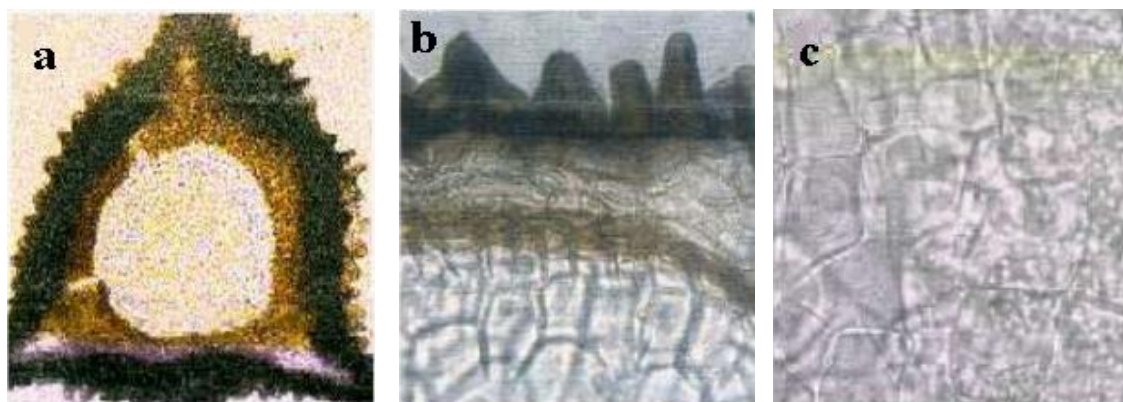
### 2.1.11 Les vitamines

La composition de la graine de *Nigella sativa* en vitamines a relèvé la présence de lles que certaines vitamines thiamine (B1), riboflavine (B2), pyridoxine (B6), niacine (B3 ou vitamine PP), acide ascorbique (C), et acide folique (B9), carotène, une provitamine (A) (**Saïdi, 2009**). L'analyse de vitamines liposolubles de *Nigella sativa* a

montré la présence de toutes les classes de tocophérols, qui sont les formes naturelles de la vitamine E et qui agissent comme antioxydants (Nergiz et Ötles, 2003).

-Tocophérol :  $182.56 \pm 6.82$       -Tocophérol :  $18.56 \pm 0.13$ )

- Tocophérol :  $142.97 \pm 7.56$       -Tocophérol :  $17.62 \pm 0.20$ )



**Figure 7** : Observations microscopiques de différents tissus de la graine de *Nigella sativa*. (a) x 100 - (b) x 400 - (c) x 4000. (Cihan, 2012).

## 2.2 Les huiles essentielles

### 2.2.1 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent de façon quasi-exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phényl propane (beaucoup moins fréquent) d'autre part (Bruneton, 1993).

#### 2.2.1.1 Les terpénoïdes

Parmi les terpénoïdes rencontrés dans les huiles essentielles les terpènes, les monoterpènes et sesquiterpènes. Les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités « isopréniques » ( $C_5H_8$ ), soit deux unités pour les monoterpènes ( $C_{10}H_{16}$ ) et trois pour les sesquiterpènes ( $C_{15}H_{24}$ ). Exceptionnellement, quelques diterpènes ( $C_{20}H_{32}$ ) peuvent être présent dans les huiles essentielles (Vila *et al.*, 2002).

### 2.2.1.1.1 Les monoterpènes

Les carbures monoterpéniques peuvent être acycliques (myrcène, ocimène...), monocycliques (  $\alpha$ -terpène, p-cymène) ou bicycliques (pinène, camphène, sabinène...). Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (citrus, térébenthine). En plus de ces carbures, plusieurs molécules fonctionnalisées sont rencontrées telles que : Les alcools : ils peuvent être acycliques (géraniol, linalool), monocycliques (menthols, terpinene-4-ol), bicycliques (bornéol, fenchol); Les aldéhydes: le plus souvent ils sont acycliques (géraniol, néral, citronellal) ;Les cétones: acycliques (tagetone), monocycliques (menthone, carvone). Les esters : pouvant être acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate decitronellyle); monocycliques (acétate de menthyle), bicycliques (acétate d'isobornyle) ; Les éthers: cinéole (appelé également eucalyptol) ;-Les peroxydes : ascaridole ; Les phénols : thymol, carvacrol.

### 2.2.1.1.2 Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes rencontrés dans la série des monoterpènes composés de : les carbures ( $\beta$ -bisabolène,  $\beta$ -caryophyllène), les alcools (farnésol, carotol), les cétones (nootkatone,  $\beta$ -vétivone), les aldéhydes (sinensals), les esters (acétate de cédryle).

### 2.2.1.2 Les composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane ( $C_3$ - $C_6$ ) sont moins fréquents que les précédents. Ce sont très souvent des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristique de certaines huiles essentielles d'Apiacées (anis, fenouil, persil) : anéthole, anisaldéhyde apiole, méthyl-chavicol, mais aussi de celles de girofle, de la muscade, de l'estragon, de l'acore, des cannelles, (eugénol, myristicine, asarones, cinnamaldéhyde). Des composés en  $C_1$ - $C_6$  telle que la vanilline ou l'anthranilate de méthyle peuvent être également rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 1993).

### 2.2.1.3 Les composés d'origines diverses

Selon le mode de récupération utilisé, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de



l'hydrodistillation : carbures (linéaires et ramifiés, saturés ou non), acides (C<sub>3</sub> – C<sub>10</sub>), alcools, aldéhydes, esters acycliques, lactones. Dans les concrètes, il n'est pas rare de trouver les produits de masse moléculaire plus importante, non entraînés à la vapeur d'eau : homologues des phenylpropanes, diterpènes coumarines etc. (**Bruneton, 1993**).

### 2.2.1 Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

On trouve généralement les HE incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire. Toutes les HE sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HE de cannelle, de girofle et de saffran. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation.

### 2.3 Composition chimique de l'huile essentielle de la nigelle

L'analyse de l'huile par GC-MS réalisée par (**Burits et Bucar 2000**) a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont des monoterpènes ; la thymoquinone (27,8%-57%), p-cymène (7,07-15,83%), carvacrol (5,8-11,6%), longifolène (1,2-8%), 4-terpinol (1,98-6,59%), et le tanéthol (0,25-4,28%). Contrairement à l'étude précédente, (**Moretti et al., 2004**) ont trouvé que le composant majeur est le p-cymène suivi du thymol alors que la thymoquinone présente un taux faible. Récemment, L'huile essentielle de *Nigella sativa* cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar), extraite par deux méthodes différentes ; l'hydrodistillation et distillation par micro-onde a été analysée par CPG et GC-MS, 112 composés ont été identifiés et caractérisés, le p-cymène représente toujours le composé le plus abondant suivi de la thymoquinone (**annexe 1**).

### 2.3.1 Composés majoritaires de l'huile essentielle de la nigelle

#### 2.3.1.1 Thymoquinone

Thymoquinone est une molécule incontournable des études actuelles sur *N. sativa*. Le constituant majeur de l'huile volatile a été synthétisé en 1941 par Kremers et son

équipe (**Kremers *et al.*, 1941**). La thymoquinone est une quinone monoterpénique : 1,4-dione,2-méthyl,5-(1-méthylethyl) 2,5-cyclohexadiène. Elle a la particularité d'être présente à la fois dans l'huile fixe (0,05% à 0,15 %) et dans l'huile essentielle avec des teneurs très variables suivant la provenance : de 0,6 % à parfois plus de 27,8%. La photodimérisation de la TQ aboutit à la dithymoquinone anciennement citée sous le nom de nigellone, soluble dans les solvants organiques tels que l'éther, le chloroforme ou l'éthanol et partiellement dans l'eau. En 1963, El Dakhakhny a réexaminé le processus d'extraction de l'huile volatile et a réussi à isoler un composé cristallin jaune vif. Il possède un point de fusion de 45-47°C, sa formule moléculaire est C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>, et son poids moléculaire de 164,2 g/mol (**Akram, 1999**). La polymérisation de la thymoquinone permet d'obtenir la nigellone, qui retienne la plupart des propriétés pharmacologiques de la thymoquinone, est dénuée de tout effet toxique (**Mahfouz *et al.*, 1960 ; Abdel-Fattah *et al.*, 2000**).

### 2.3.1.2 Carvacrol

(2 - méthyl - 5-(1-méthyl éthyl) phénol, connu sous le nom de 2- hydroxy-p-cymène ou isothymol) est un phénol monoterpénoïde. Le carvacrol a un arôme chaud et piquant et possède divers sites d'actions directes ou indirectes au sein des cellules bactériennes (**Kunle *et al.*, 2003**). Le carvacrol inhibe la croissance de nombreuses souches bactériennes par exemple *E.coli* et *Bacillus cereus*. Sa faible toxicité, son goût et son arôme agréable ont conduit à son utilisation comme additif alimentaire afin de prévenir la contamination bactérienne (**Ultee et Smid, 2002**). Le carvacrol provoque des lésions de la membrane cellulaire chez *Pseudomonas aeruginosa*, contrairement à d'autres terpènes, qui inhibe la prolifération de ce germe (**Cox et Markham, 2007 ; Di Pasqua *et al.*, 2007 ; Cristiani *et al.*, 2007**).

### 2.3.1.3 p-cymène

(isopropyl toluène) Le p-cymène, rencontré dans de nombreuses plantes et manifeste aucune activité biologique et se présente sous la formule suivante : C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>  
Densité (857,00 kg/m<sup>3</sup>) Masse molaire (134,21 g/mol) Point d'ébullition (177°C)  
Point de fusion( 68°C).

## 2.4 Rendement des huiles essentielles de *Nigella sativa*

Le rendement comme la composition de l'huile essentielle diffèrent d'une région à l'autre, du principalement à la différence de variétés des graines (**Tableau 8**).

**Tableau 8** : Présentation des teneurs en huiles fixes et H.E de *Nigella sativa* selon différents auteurs.

Auteurs	Composition en huile fixe	Composition en huile essentielle
Hosseinzadah <i>et al.</i> , 2007	36 à 38%	0.4 à 2.5%
Ali et Blunden.G 2003	36 à 38%	1.4%
Burtis et Bucar 2000	40%	1.4%
Benkaci <i>et al.</i> , 2006	35%	0.34%
Mehemet <i>et al.</i> , 2005	30%	1.4%
Hiller, 1999	38%	1.5%
Dominic <i>et al.</i> , 1991	31%	0.42%

## 1 Propriétés anti-infectieuses et thérapeutiques de l'H.E *N.sativa*

### 3.1 Propriétés antibactériennes

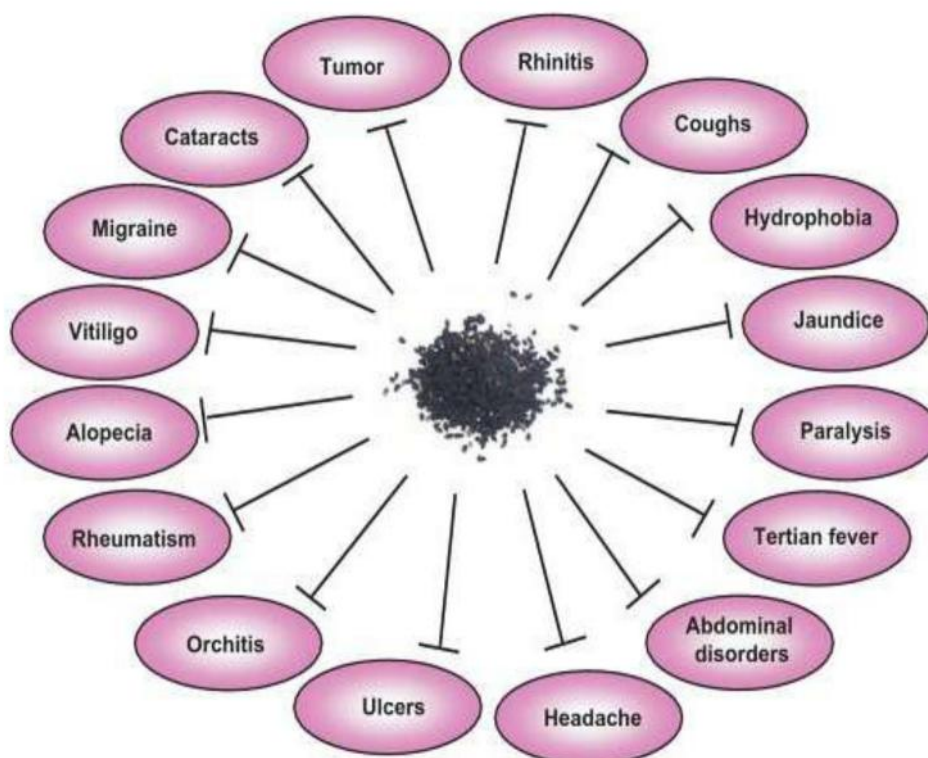
L'huile essentielle et la thymoquinone inhibent la croissance d'une large gamme de bactéries. Les souches bactériennes commensales et même pathogènes sont inhibées par la thymoquinone. L'huile ou les graines broyées de nigelle, sont utilisées dans application externe, afin de traiter certaines affections cutanées. Une étude *in vitro* par la méthode de diffusion sur disque a mis en évidence la forte activité inhibitrice de l'huile essentielle diluée au centième contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Vibrio cholerae*, avec une plus forte action sur les bactéries Gram (+) (**Ali et Blunden, 2002**). Une étude antérieure réalisée par (**Ferdous *et al.*, 1992**) sur 37 entérobactéries, dont *Shigella spp* a permis la détermination des concentrations inhibitrices médianes (IC50) de 50-400 µg/mL. L'extrait méthanolique a montré une forte action inhibitrice contre *Streptococcus mutans* avec une IC50 10-30 µg/mL (**Khan, 1999**). L'effet antibactérien de l'huile essentielle à une concentration de 4,4 mg/mL est révélé être très efficace, voire l'amoxicilline à 20 µg/mL sur les bactéries Gram (+) telles que *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, et sur les Gram (-) telles que *E. coli* et

*P. aeruginosa* (El-Kamali *et al.*, 1998). L'extrait de l'éther a également montré une forte activité antibactérienne contre les bactéries Gram (+) et (-) (Sokmen *et al.*, 1999). L'extrait de diéthyle éther est mis en évidence vis-à-vis de nombreux germes. L'extrait méthanolique et l'extrait aqueux ont manifesté également une activité inhibitrice contre de nombreuses bactéries isolées dans l'arthrite septique. La croissance des souches résistantes aux antibiotiques telles que *V. cholerae*, *E. coli* et *Shigella dysenteriae* est totalement inhibée en présence des extraits étudiés (Morsi, 2000). L'extrait et l'huile fixe de *Nigella sativa* a présenté un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes. L'huile essentielle même diluée au 1/100 exerce une importante activité sur des germes Gram positif et Gram négatif, dont *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella niger*, *Vibrio choléra*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus albus* (Agrawal *et al.*, 1979 ; Hanafy et Hatem, 1991 ; Morsi , 2000).

### 3.2 Propriétés antifongiques

De même, l'extrait méthanolique et hexanique possèdent aussi un effet inhibiteur très considérable sur *Candida albicans*, *Staph aureus* et *Pseud aeruginosa*. L'huile fixe présente également une excellente activité antifongique, notamment sur *Aspergillus niger* (Agrawal *et al.*, 1979). Par ailleurs, l'extrait à l'éther et la thymoquinone exercent une activité inhibitrice sur huit espèces dermatophytes. L'huile de *Nigella sativa* possède aussi un effet antiviral vis-à-vis du virus de l'herpes.

*Nigella sativa* a attiré l'attention des chercheurs pour lui attribuer à l'avenir le statut de médicament à part entière. Les HE végétales, utilisées par voie interne ou externe, sous forme de Teinture, d'extrait aromatique, d'infusion etc (Garnier *et al.*, 2009). Les huiles essentielles agissent quasiment dans tout les domaines de la santé et de la maladie. Leurs applications sont vastes et requièrent de bonnes connaissances (Bachelot *et al.*, 2006 ).



**Figure 8 :** Usages traditionnels de *Nigella sativa* (Aggarwal *et al.*, 2009).

Depuis quelques années de nombreuses publications scientifiques paraissent régulièrement que ce soit pour étudier la composition des graines de Nigelle et de ses extraits, les huiles extraites des graines sont les deux constituants de la plante les plus utilisées en médecine traditionnelle et les seules commercialisées en Europe (les graines l'étant pour un usage culinaire). La plupart des activités pharmacologiques attribuées à *N. sativa* provenaient de son huile essentielle. en 1963, la thymoquinone, monoterpène oxygéné, sont isolés par El-Dakhakhny, à partir des huiles de nigelle.

32 constituants ont été identifiés par GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectroscopy*), dont la majorité sont des monoterpènes : *p*-cymène (38%), thymoquinone (30%), carvacrol (5-11%), -pinène (5-14%), -pinène (5%), limonène (4%), longifolène (1,2-8%), 4-terpinéol (1,98-6,59%) et *t*-anéthol (0,25-4,28%) (Burits et Bucar, 2000).

### 3.3.1 Activités antioxydantes

Plusieurs études *in vitro* se sont intéressées à l'activité antioxydante de l'huile essentielle de nigelle (**Boyd et al., 2003 ; Vansant, 2004 ; Hale, 2003**). Les monoterpènes (thymoquinone, carvacrol, t-anéthol et 4-terpinéol) possèdent une activité anti-radicalaire (**Burits et Bucar, 2000 ; Kruk, 2000 ; Gee et Johnson, 2001**). Une étude comparative des graines de nigelle et de la plante de romarin (*Rosmarinus officinalis*) de leur capacité à prévenir l'auto-oxydation d'une huile végétale, a permis de montrer d'une part que la capacité antioxydante des extraits éthanoliques était supérieure aux extraits aqueux et d'autre part que la graine de nigelle a une capacité antioxydante supérieure à celle du romarin. Divers travaux ont indiqué que la graine de nigelle possède des principes ayant une activité antioxydante et qui lui confèrent une forte action hépatoprotectrice vis-à-vis du stress oxydatif occasionné par différentes substances (**Fabienne, 2005**).

### 3.3.2 Propriétés antitumorales

L'espoir de trouver une nouvelle substance antitumorale a motivé les très nombreuses études des propriétés cytotoxiques de la nigelle. Le constituant principal, la thymoquinone, a manifesté une aptitude à inhiber les cellules cancéreuses *in vitro* et la croissance des tumeurs *in vivo*. La thymoquinone a un mode d'action comparable à certains médicaments chimiothérapeutiques : arrêt du cycle cellulaire en une phase donnée et induction de l'apoptose (**Fabienne, 2005**). Mais de nombreuses études sont encore nécessaires pour éventuellement valider cet effet chez l'homme. Elle a aussi expérimentalement montré des activités neuroprotectrices chez la souris et (**Ahmed et al., 2011**). gastroprotectrices chez le rat (**El-Abhar et al., 2003**). ainsi qu'un effet protecteur (chez la souris) contre les dommages du foie face à l'infection par un *Schistosoma* (*Schistosoma mansoni*) (**Mahmoud et al., 2002**).

### 3.3.3 Effet sur les allergies

Une étude réalisée sur 152 personnes présentant des maladies allergiques (Rhinite-allergique, asthme bronchique, eczéma atopique etc...) a montré une diminution

significative des symptômes chez les patients traités avec l'huile de *Nigella sativa* à une dose de 40 à 80mg/kg/j.

### 3.3.4 Effet sur le système gastro-intestinal

L'huile de graines de *Nigella sativa* protège contre les lésions gastriques induites par le processus d'ischémie-réperfusion et ceci grâce à leur pouvoir anti-radicalaire. (El-Abhar *et al.*, 2003). L'extrait alcoolique des graines de *Nigella sativa* présente également une activité antiulcéreuse qui a été attribuée aux flavonoïdes qu'il contient.

### 3.3.5 Activité hypoglycémiante de *Nigella sativa*

La graine de Nigelle est traditionnellement employée pour traiter le diabète. Les travaux ont montré l'effet sur la glycémie chez différents modèles animaux rendus expérimentalement diabétiques (diabète gras) : hamsters, rats et lapins. Le traitement avec diverses préparations de *Nigella sativa* engendre systématiquement une diminution de la glycémie chez différents modèles animaux. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette activité. Ainsi chez le lapin rendu diabétique par l'alloxane, *Nigella sativa* présente une action hypoglycémiante (El-Hader *et al.*, 1993). Ainsi un certains nombres de groupes, tels que des alcaloïdes, des saponines, des flavonoïdes des glycosides, des polysaccharides, des peptidoglycanes, acides aminés et d'autres obtenus à partir de diverses sources végétales, semblent avoir des effets, d'une importance particulière, dans le traitement du diabète (Mukherjee *et al.*, 2006 ; Soumyanath, 2006).

### 3.3.6 Autres actions pharmacologiques

Plusieurs autres activités pharmacologiques de *Nigella sativa* ont été décrites dans la littérature, la liste suivante en cite quelques unes. Effet sur l'activité cardio-vasculaire (Zaoui *et al.*, 2000), Activité sur la réponse immunitaire (Mahmoud *et al.*, 2002), respiratoire (Boskabady *et al.*, 2004), Activité hypocholestérolémiante de *N. sativa* (Tissera *et al.*, 1998), Action sur la masse pondérale (Labhel *et al.*, 2009), Activité anti-inflammatoire et analgésique (Gilani *et al.*, 2004).

---

# **CHAPITRE 2**

## **MATERIEL ET METHODES**



## 1 Matière première végétale



**Figure 9 :** Graines de *Nigella.sativa*



**Figure 10:** Observation des graines de *Nigella sativa* avec un grossissement de 250x

### 1.1 Etat sanitaire des graines

L'état sanitaire des graines est apprécié à l'aide de la détermination des aspects suivants :

L'état "physique" des graines (teneur en eau, température, propreté, masse volumique)

L'état biochimique

L'état d'infection (microorganismes).

La qualité des graines (**Figure 9 et 10**).

## 2 Caractérisation de la matière végétale

### 2.1 Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité de la matière végétale est déterminé par la méthode de Dean et Stark ou par la méthode physique (méthode gravimétrique, détermination de la perte de poids par dessiccation) par l'introduction d'une pesée de 10 g de la graine de Nigelle broyée, placée dans une coupelle tarée, dans une étuve réglée à  $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Les échantillons sont ensuite pesés avec précision toutes les vingt-quatre heures, refroidis à température ambiante dans un dessiccateur, et ce jusqu'à obtention d'un poids constant (**Lazouni et al., 2007**).

$$H \% = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

**m1** : Poids de la capsule + échantillon.

**m2** : Poids de la capsule après étuvage.

**m0** : Poids de la capsule vide (Twidwell, *et al.*, 2002).

## 2.2 Détermination du taux de matière sèche

Le taux de matière sèche est déterminé sur la norme AFNOR B51-004. La matière végétale est introduite dans un creuset taré, séchée dans une étuve à une température de 130°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le creuset est refroidi dans un dessiccateur, ensuite pesé. Le taux de matière sèche est donné par la formule suivante :

$$MS \% = \frac{S}{E} \times 100$$

**MS** : Matière sèche.

**S** : Masse du creuset sortie dessiccateur moins la tare.

**E** : Masse de matière végétale.

## 2.3 Détermination du taux de matière minérale

Le taux de matière minérale est déterminé selon la norme AFNOR T211-93. Le creuset contenant la matière sèche est introduit dans un four à moufle à une température de 550°C pendant un intervalle de temps de trois heures. Une carbonisation de la drogue permet l'élimination de toute matière organique. Le creuset est ensuite pesé après refroidissement dans un dessiccateur. La fraction de la masse minérale est donnée par la relation suivante.

$$M.M \% = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

**m0** : Poids du creuset vide.

**m1** : Poids du creuset + échantillon avant incinération

**m2** : Poids du creuset après incinération

## 2.4 Détermination du taux de matière organique

Le pourcentage de matière organique contenu dans les graines est déterminé par la différence entre la matière sèche et la matière minérale.

$$MO = M.S - M.M$$

**MO** : matière organique.

**MS** : matière sèche.

**MM** : matière minérale.

## 3 Examen phytochimique des graines de *Nigella sativa*

La méthode du screening par réactions en tubes, permet d'identifier quelques grandes familles chimiques (les alcaloïdes, les polyphénols, les saponosides etc.. (Sunan *et al.*, 2011). Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation des composés des grandes familles chimiques présentes (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Réactifs utilisés dans la caractérisation des familles chimique (Ngagegni, 2012).

Familles chimiques	Réactifs	Composition des réactifs	Résultats positifs Coloration
Alcaloïdes	Draragendorf	Nitrate de bismuth + acide acétique	précipité rouge orangé
	Mayer	iodure de potassium + chlorure de mercure	Précipité jaunâtre
Flavonoïdes	Shinoda	Ethanol 95 °+ HCl (N/2) + (Mg ou Zn)	orangée, rouge ou violette
Stéroïdes et Terpénoïdes	Lieberman Boucha	Anhydride acétique + d'acide sulfurique	violette – bleue ou verte
Tannins	FeCl <sub>3</sub> 1 %	FeCl <sub>3</sub> 1 %	bleu- foncée,
	Stiasny	HCl / Formol	verte ou noire
Polyphénols	Barton	FeCl <sub>3</sub> 1 % + Fe (CN) <sub>6</sub> (50%, v/v)	bleu-noirâtre ou verte
Quinone	Bornstraëgen		rouge ou violette
Anthocyanes	HCl 20%		rose à rouge-orangé
Saponosides	H <sub>2</sub> O distillée		Indice Mousse (IM*) test positif si IM>100

Les résultats ont été évalués comme suit :(+++) Fortement positif (++) Moyennement positif (+) Faiblement positif (-) Négatif.

### **3.1 Extraction du matériel végétal par l'éthanol**

Un volume de 300 ml d'éthanol est ajouté à une pesée de 50 g du matériel végétal introduite dans un ballon nonocol menu d'un réfrigérant. Le mélange est ensuite chauffé à une température de 100°C pendant une heure. L'extrait est récupéré par filtration est soumis aux tests suivants.

#### **3.1.1 Recherche des alcaloïdes**

Un volume de 10 ml d'acide sulfurique à une concentration 10 % est ajouté une pesée de 1 g de la poudre végétale introduite dans un tube à essai. Le mélange est ensuite agité pendant 2 min, et filtré. Le filtrat récupéré est réparti en trois tubes. Deux gouttes de réactif de Mayer, de Dragendorff et d'iodoplatinate de potassium sont ajoutées aux trois tubes respectivement.

#### **3.1.2 Recherche des flavonoïdes**

La présence des flavonoïdes est mise en évidence par un test simple et rapide appelé " réaction de Shinoda" (Lock *et al.*, 2006). Cette technique consiste à introduire un volume de 1 ml de l'extrait et quelques gouttes d'une solution de 2N HCl avec une pesée de 0,5g de magnésium métallique sont ajoutées. Le mélange est soumis à une agitation pendant 3 minutes. La présence des flavonoïdes se manifeste par l'apparition d'une couleur rouge-orange ou rouge-violacé.

### **3.2 Extraction du matériel végétal avec l'eau chaude**

Une pesée de 50 g du matériel végétal introduite dans un ballon nonocol menu d'un réfrigérant, est ajoutée à un volume de 300 ml d'eau distillée. Ensuite, le mélange est chauffé jusqu'à l'ébullition pendant un intervalle de temps d'une heure. L'extrait est récupéré par filtration est soumis aux tests suivants.

### 3.2.1 Recherche des saponosides

Un volume de 2-6 ml d'eau distillée est ajouté à la solution aqueuse obtenue, soumis à une agitation. Le mélange est incubé à une température ambiante pendant 20 minutes. La présence d'une écume superficielle manifeste la présence des saponosides

La détermination de la teneur en saponosides est procédée comme suit :

Pas de mousse	→	test négatif.
Mousse inférieur à 1 cm	→	test faiblement positif.
Mousse de 1 à 2 cm	→	test positif.
Mousse supérieur à 2 cm	→	test très positif.

## 4 Extraction de l'huile essentielle

La matière première utilisée dans ce present travail est les produits cosmétiques (huiles végétales de nigelle) disponibles sur le marché local. Le premier produit est de fabrication algérienne (Miracle), le second provient d'Arabie saoudite (Abou-Jamel).

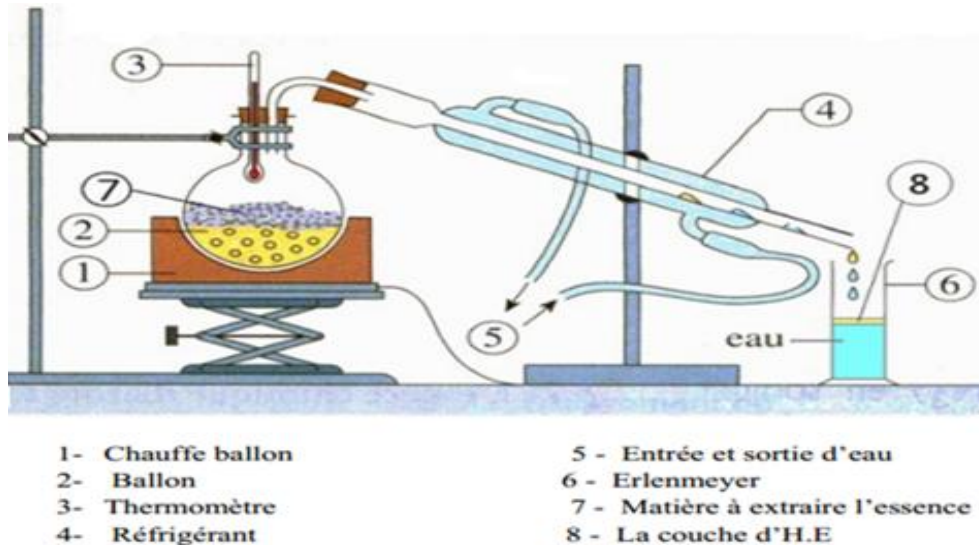
 <p style="text-align: center;"><b>Huile de Nigelle fabriquée en Algérie.</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Huile de Nigelle fabriquée en Arabie saoudite.</b></p>
<p>Les seules indications portées sur la notice sont :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantité 60 ml.</li> <li>• Non commercial : "Miracle".</li> <li>• Adresse: Huilerie MESQA lot 104 bab-ezzouar Alger.</li> <li>• Obtention : expression à froid, conformément aux normes internationales et législation européenne CE (N° 86/392/CEE) du décret N° 92-765 du 29 juillet 1992.</li> <li>• Fabrication :</li> <li>• Expire :</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantité : 250 ml.</li> <li>• Fabrication :</li> <li>• Expire :</li> <li>• Société de fabrication des huiles JEDDAH Arabie saoudite.</li> <li>• Autorisation N° : 819/S.</li> <li>• N° : 4030126961.</li> </ul>

**Figure 11 : Présentation des deux produits cosmétiques.**

#### 4.1 L'huile essentielle obtenue à partir de l'huile végétale

L'hydrodistillation demeure la technique la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles et fournir de meilleurs rendements. (Ferhat *et al.*, 2010).

L'hydrodistillation est assurée grâce à un appareil de type Clevenger (Figure 12). Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. La vapeur chargée d'huile essentielle arrive dans le condenseur, ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Une fois condensées, l'eau et les molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique. Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons de couleur brune, hermétiquement fermés et stockées au réfrigérateur à 4°C (Bendahou *et al.*, 2007 ; Baser et Buchbauer, 2010). Un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Ferhat *et al.*, 2010).



**Figure 12:** Présentation schématique du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005).

## 4.2 Rendement en huile essentielle

Le volume d'huile essentielle récupéré dépend du rendement de distillation, qui est variable, chez une même plante, en fonction de la saison. (Gonny *et al.*, 2004). Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la matière à traiter (Carré, 1953). Le rendement est exprimé en pourcentage il est calculé par la formule suivante.

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P_B}{P_A} \times 100$$

Rdt	→	en %.
P <sub>A</sub>	→	Poids de la plante en g.
P <sub>B</sub>	→	Poids de l'H.E en g.

## 5 Etude physico-chimique de l'HE de *Nigella sativa*

### 5.1 Caractéristiques physiques de l'HE de la nigelle

Selon les normes (AFNOR, 2000), une huile essentielle qualifiée de très haute qualité présente une densité relative, un pouvoir rotatoire et un indice d'ester plus élevé qu'une huile de basse qualité, avec un indice de réfraction plus bas.

#### 5.1.1 La densité relative « Norme NFT 75-111, ISO 279-1981 »

La densité relative d'une huile est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C. La densité relative est mesurée par à l'aide d'un pycnomètre. Après nettoyage, séchage et le pesage du pycnomètre, est rempli avec un volume d'eau distillée récemment bouillie et refroidie et plongé dans un bain d'eau jusqu'à que l'eau atteigne une température de 20°C. Le pycnomètre est ensuite retiré, essuyé extérieurement et pesé. La mesure de la densité relative est précédée de la même façon, elle est calculée par la formule suivante. (Guenter, 1972).

$$D_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

$m_2$	→	masse du pycnomètre rempli d'H.E
$m_1$	→	masse du pycnomètre rempli d'eau
$m_0$	→	masse du pycnomètre vide

### 5.1.2 Le pouvoir rotatoire "Norme NFT 75-113, ISO 592-1981 "

Le pouvoir rotatoire est obtenu à l'aide d'un polarimètre de type JASCO 1010 (réglé de façon à donner  $0^\circ$  et  $180^\circ$  avec l'eau). La source lumineuse utilisée est une lampe à vapeur de sodium, qui permis l'obtention d'une lumière de longueur d'onde  $589,3 \pm 0,3$  nm à l'aide d'un tube d'observation de  $100 \pm 0,5$  mm de longueur.

La technique consiste à préparer une dilution de l'essence de la nigelle de 0,25g/100 ml d'éthanol. Ensuite, le tube est rempli avec l'échantillon préparé en assurant la disparition complète bulle d'air interposée et placé dans le polarimètre, qui permis de lire l'angle de rotation de l'échantillon. Le pouvoir rotatoire exprimé en milli-radians, est calculé par la formule :

$$\alpha_D^t = \frac{A}{L} \times 100$$

**A** : La valeur de l'angle de rotation exprimé en milli-radians et/ou degré d'angle.

**L** : La longueur du tube utilisé exprimé en mm.

### 5.1.3 Indice de réfraction "Norme NFT 75-112, ISO 280-1976 "

L'indice de réfraction des huiles fluides est réalisé à l'aide d'un réfractomètre de type Abbe thermostaté, mesuré à une température de  $20^\circ\text{C}$ . La lecture directe des indices de réfraction se situe entre 1,3000-1,7000.

La mesure de l'indice de réfraction d'une huile essentielle est effectuée à l'aide d'un réfractomètre à une température de  $20^\circ\text{C}$  et à raie D de sodium 590 nm. La technique consiste à déposer une goutte de l'échantillon entre les prismes du réfractomètre. Le réglage s'effectue jusqu'à l'obtention d'une séparation nette entre deux plages horizontales (demi-cercle), l'un sombre l'autre claire (**AFNOR**).



L'indice de réfraction est calculé par la formule suivante :

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0.0004 (t - t')$$

$n_D^{t'}$  : La valeur de la lecture obtenue à la température  $t'$

$n_D^t$  : La température de référence  $t$

$t$  : La température de mesure

#### 5.1.4 Miscibilité à l'éthanol "Norme NFT 75-101, ISO 875-1981 "

Une huile essentielle est miscible à un volume défini X d'éthanol, à une température de 20°C, lorsque le mélange d'un volume d'une huile essentielle avec un volume d'éthanol est limpide, après l'ajout graduel d'éthanol jusqu'à l'observation d'une miscibilité à l'œil.

## 5.2 Caractéristiques chimiques

Les indices d'acide et d'ester sont qualifiés comme critères de qualité les plus importants pour une huile essentielle.

#### 5.2.1 Indice d'acide " Norme NFT 75-103, ISO 1242-1980 "

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle. Une pesée de 2 g de l'huile essentielle est introduite dans un ballon, mélangée avec un volume de 5 ml d'éthanol et 5 gouttes d'une solution de phénolphtaléine ou le rouge de phénol. L'indice d'acide est calculé par la formule :

$$5.61 V / m$$

**V** : Le volume en millilitre de la solution d'hydroxyde de potassium.

**M** : La masse en gramme, de la prise d'essai.

**5.61** : Correspond à 0.1 mol/l de KOH.

## 6 Matériel biologique

Dans le but de tester l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Nigella sativa*, le choix des bactéries est porté sur des germes fréquentes responsables des toxi-infection-alimentaires, des infections nosocomiales, caractérisés par leur leurs résistance aux divers agents antimicrobiens. Le premier groupe de bactéries témoins

de l'activité antibactérienne utilisé dans ce présent travail sont d'origine clinique, CHU de Sidi Bel Abbes et référencées. Cinq (5) bactéries Gram négatif (*E.coli* ATCC 25922, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* et *P.aeruginosa* ATCC 27853), une (1) Gram positif (*St. Aureus* ATCC 25923) et deux (2) levures (*Candida albicans* et *Rodotorula*). Le deuxième groupe de bactéries témoins de l'activité antibactérienne utilisé dans ce présent travail sont d'origine clinique. Cinq bactéries Gram négatif (*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Vibrion cholérique*, *Salmonella paratyphi a*, et *Pseudomonas aeruginosa*, Quatre (4) Gram positif (*Staphylococcus epidermis*, *Bacillus cereus*, *Listeria sp* et *Enterococcus faecalis*).

### **6.1 Conservation des souches bactériennes**

A partir des jeunes cultures (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min, conservées dans milieu de culture de conservation contenant du lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol à une température -20°C. Les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0,5% d'extrait de levure, avant chaque ensemencement (Saidi *et al.*, 2002).

### **6.2 Purification et conservation des levures**

Les levures du genre *Candida* croissent sur de nombreux milieux. La culture du genre *Candida* est réalisée sur milieu de culture de Sabouraud additionné de chloramphénicol ou de gentamicine. Les colonies de levures sont blanc crème. *Candida* pousse à une température de 25°C pendant 48 heures. L'examen direct permet une orientation rapide du diagnostic. Les levures apparaissent sous forme arrondie ou ovale, de 4 µm à 8 µm, éventuellement bourgeonnantes. Les levures sont également visibles sur des frottis colorés au MGG (May-Grünwald-Giemsa) ou au Gram (les levures sont à Gram positif). L'identification traditionnelle des levures s'effectue à l'aide de critères phénotypiques, comme la formation d'un pseudomycélium sur milieu pauvre, de chlamydospores, et l'assimilation ou la fermentation de certains sucres à l'aide de galeries d'identifications commerciales.

## 7 Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE

la méthode de diffusion sur l'agar et la dilution sur milieu de culture liquide sont largement utilisées dans la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (Malecky, 2007; Pauli et Schilcher, 2010; Celiktas *et al.*, 2007).

Par ailleurs, la diffusion sur la gélose et la dispersion en micro atmosphères sont préconisées pour la mise en évidence de l'activité biostatique.

**Nb :** L'efficacité de l'huile essentielle testée est évaluée par la mesure de 3 concentrations : CMI, CMB et CMF. (Ces trois concentrations peuvent être exprimées en µg/ml en µl/ml ou en % (Tableau 10).

Lorsque le rapport :

CMB/CMI= 4 (l'ATB est bactéricide)

CMB/CMI= 8 à 16 (l'ATB est bactériostatique)

CMB/CMI= 32 (La bactérie est tolérante à l'ATB)

**Tableau 10 :** Le pouvoir inhibiteur des H.E vis-à-vis d'une souche microbienne classé selon (Koba *et al.*, 2004).

Excellent pouvoir inhibiteur	CMI < 50 µl/ml
Pouvoir inhibiteur intéressant	50 µl/ml et 250 µl/ml
Pouvoir inhibiteur faible	250 µl/ml et 500 µl/ml
Pouvoir inhibiteur médiocre ou nul	CMI > 500 µl/ml

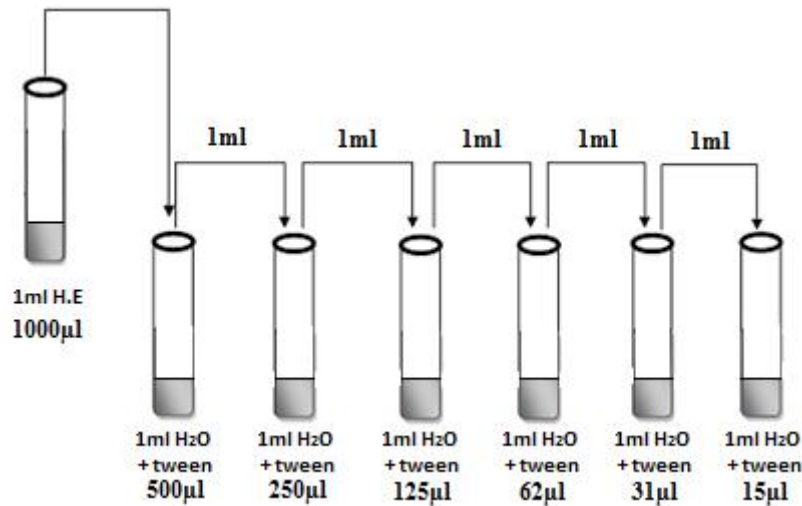
### ❖ Préparation des disques

Le papier Wattman N°1 est utilisé pour la préparation des disques de 6 mm de diamètre. Les disques préparés, sont placés dans un tube à essai et autoclavés à une température de 120°C 20 mn (Le minor *et al.*, 1989).

### ❖ Préparation des dilutions de l'H.E de *Nigella sativa*

Une solution de Tween 80 d'une concentration de 2,5% préparée dans l'eau distillée est stérilisée à une température de 120°C pendant 15 minutes. Une série de tubes à

essai contenant un volume de 1 ml de la solution eau distillée, additionné de Tween 80 est préparée. Ensuite, des dilutions décimales ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) sont préparées. Les concentrations (v/v) des huiles essentielles sont utilisées afin de déterminer l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme (**Figure 13**).



**Figure 13** : Préparation des dilutions de l'HE de *Nigella sativa*.

#### ❖ Préparation de l'inoculum

Une suspension bactérienne  $10^6$ - $10^8$  est préparée à partir d'une culture bactérienne âgée de 18-24 heures est inoculée sur un milieu de culture,, homogénéisée à l'aide d'un Vortex. Le milieu de culture est inoculé avec une densité optique initiale comprise entre 0,08 à 0,10 qui correspond à  $10^8$  UFC/ml (équivalent à 0.5 Mc Farland). La lecture est effectuée à la longueur d'onde de 578 nm.

### 7.1 Evaluation de l'activité antibactérienne de l'H.E par la méthode de l'aromatogramme.

L'aromatogramme est une technique utilisée en bactériologie médicale, qui permet la détermination de la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis-à-vis des huiles essentielles. Le test est effectué par l'ensemencement d'une culture bactérienne sur un milieu de culture gélosé de Muller Hinton et les levures sur une gélose Sabouraud. Un volume de 25 ml du milieu de culture gélosé introduit dans des boîtes de Pétri est ensemencé par culture en nappe avec un volume de 2 ml de l'inoculum. Ensuite, les

disques stériles imprégnés d'HE avec différentes concentrations sont déposés à la surface du milieu de culture gélosé. Les boîtes sont incubées à une température de 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 30°C pendant 48 h heures pour les levures. Un témoin a été réalisé (témoin négatif Tween 80 à 2,5 % (**Ponce *et al.*, 2003 ; Abdesselam, 2006 ; Razakarivony *et al.*, 2009**). Les résultats sont symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'H.E (**Tableau 11**)

**Tableau 11** : Résistance et sensibilité des bactéries vis-à-vis des huiles essentielles (Pharmacopée Européenne, 2002).

Sensibilité de la souche	Diamètre de la zone d'inhibition
Sensible (++)	Supérieur ou égal à 15mm
Intermédiaire (+)	Inferieur à 15 mm
Résistante (--)	Inexistant

## 7.2 Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de l'H.E

### 7.2.1 Détermination de la CMI dans un milieu liquide

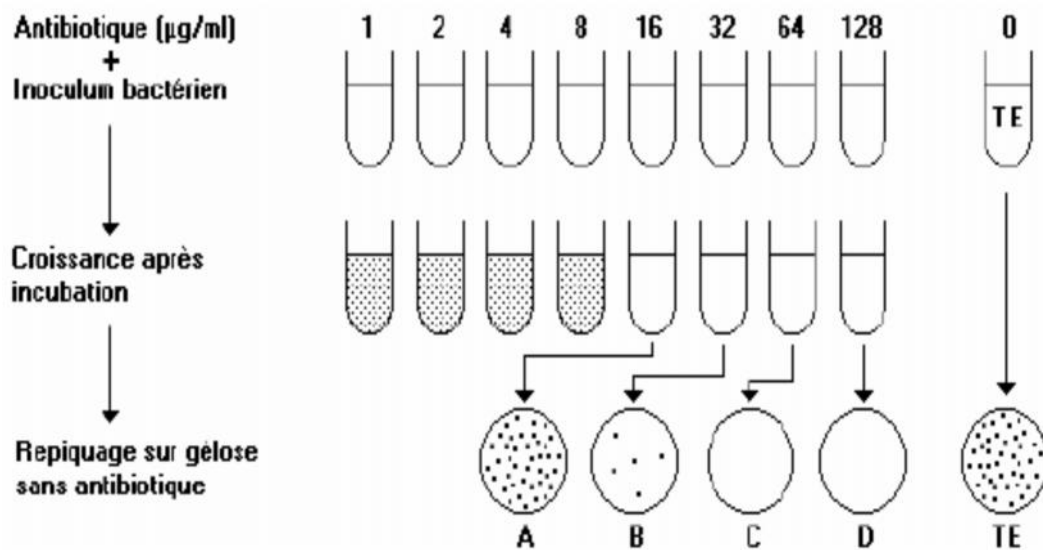
La méthode de dilutions successives sur milieu de culture solide est effectuée pour la détermination de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Cette méthode exige une standardisation rigoureuse de tous les paramètres. Par ailleurs, la méthode de dilutions successives sur milieu de culture liquide est utilisée afin d'apprécier la croissance bactérienne par l'apparition d'un trouble. Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure immédiate (**Tableau 12**) Pour évaluer l'activité bactériostatique d'une H.E en milieu liquide, on peut utiliser un indicateur rédox: la Résazurine. Cette dernière a une coloration bleue et qui est réduite sous l'action du métabolisme bactérien. (**Pauli et Schilcher, 2010 ; Klaric *et al.*, 2006 ; Caillet et Lacroix, 2007**).

**Tableau 12 :** Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI en milieu liquide et solide.

<b>Rapport de Dilution HE / H<sub>2</sub>O</b>	<b>1/2</b>	<b>1/4</b>	<b>1/8</b>	<b>1/16</b>	<b>1/32</b>	<b>1/64</b>	<b>1/128</b>	<b>1/256</b>	<b>1/512</b>	<b>1/1024</b>
<b>%</b>	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>3,12</b>	<b>1,56</b>	<b>0,78</b>	<b>0,39</b>	<b>0,20</b>	<b>0,10</b>
<b>µl H.E/ml</b>	<b>500</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>15,75</b>	<b>07,87</b>	<b>03,92</b>	<b>02</b>	<b>01</b>

### 7.2.2 Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide sur milieu de culture solide

La MBC ou MLC (Concentration Minimale Létale) peut aussi être utilisée lors d'études sur les effets antifongiques. La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle. La même gamme de concentration, réalisée par la technique de macrodilution sur milieu de culture liquide, est utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'huile essentielle à tester. Des prélèvements sont effectués dans le tube témoin et dans chacun des tubes qui ne montrent pas de turbidité ou de changement de coloration de la résazurine puis déposés « en strie » sur la gélose MH. Les boîtes ensemencées sont incubées à une température de 37°C pendant 24 heures (**Figure 14**). La CMB (% , v/v) de l'huile essentielle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie. Chaque expérience est réalisée trois fois au cours de trois expériences successives. Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur à 4, l'huile est considérée comme bactéricide.



**Figure 14 :** Détermination de la CMB sur un milieu de culture solide.

### 7.3 Evaluation de l'activité antifongique de l'H.E de *N. sativa*

#### 7.3.1 Isolements des levures

L'isolement est effectué sur milieu de culture glucosé gélosé de Sabouraud, additionné d'antibiotiques (chloramphénicol ou gentamycine). Incubé à une température de 28-30°C pendant 24-72 heures. La lecture permet de visualiser l'aspect des colonies blanches, lévuriformes.

#### 7.3.2 Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture âgée de 24-72 h, une suspension est préparée à partir des colonies de *Candida* dans un volume de 5 ml d'eau physiologique stérile, homogénéisée à l'aide d'un vortex. Le nombre de cellules de la suspension est ajusté à  $5 \times 10^7$  cellules/ml par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 640 nm (De Billerbeck, 2002). Une pré-culture est préparée par l'ensemencement du milieu de culture de Sabouraud avec une colonie de *Candida albicans*, prélevée à l'aide d'une anse de platine stérile incubée à une température de 28 à 30°C pendant 24 heures.

### **7.3.3 Evaluation de l'activité antifongique de l'H.E de *N. sativa* par la méthode de l'aromatogramme**

La Concentration Minimale Fongicide (CMF) est la concentration minimale d'agent Antimicrobien, qui permet l'inhibition totale de la croissance des champignons après incubation dans des conditions standards (Klaric *et al.*, 2006). L'activité antifongique des huiles essentielles extraites à partir des graines de *Nigella sativa L.* est mise en évidence par l'évaluation de la croissance sur milieu de culture solide.

### **7.4 Evaluation de l'activité antibactérienne des hydrolats**

L'eau aromatique contient une quantité non négligeable d'huile essentielle sous forme solubilisée (Price *et al.*, 2004). La récupération de cette huile est réalisée par extraction liquide-liquide avec un solvant organique pour effectuer l'analyse chromatographique et l'activité antibactérienne.

Notre intérêt pour la valorisation de l'eau aromatique de la nigelle est motivé par son potentiel thérapeutique à même de servir encore de tremplin à la recherche scientifique pour l'élaboration de nouvelles préparations galéniques à visée thérapeutique et à grande valeur ajoutée ou encore de substances ayant de belles perspectives sur le créneau du bien-être.

## **9 la cinétique de la croissance bactérienne**

La mesure de la croissance bactérienne en présence et en absence de l'huile essentielle permet l'étude de l'activité antibactérienne au cours du temps. Elle évalue la croissance des bactéries traitées avec différentes concentrations de huiles essentielles à des intervalles de temps trop lent (Viljoen *et al.*, 2003). La mesure de la croissance bactérienne est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre visible de marque Philips (Pyeunicam SPG-250) avec l'utilisation d'une micro-cuvette en verre ou en plastique de 1 cm de chemin optique, à une longueur d'onde de 578 nm avec. Les courbes de la croissance obtenues en présence d'huiles essentielles représentent la CMI, et la courbe de croissance de la population témoin sont présentées dans le chapitre des résultats.



## 10 Dosage des protéines méthode de Warburg et Christian

Les méthodes de dosage des protéines totales sont nombreuses et présentent chacune des caractéristiques différentes : sensibilité, interférents, réponse plus ou moins différente selon la composition en acides aminés .... Le choix d'une méthode dépend donc du contexte. Citons quelques méthodes : par l'intermédiaire du dosage de l'azote total protéique, par mesure de l'absorbance intrinsèque à 280 nm, par méthodes photométriques après mise en œuvre d'une réaction chimique ou de la fixation d'un colorant.

Warburg et Christian ont développé une méthode pour déterminer la concentration protéique d'un mélange contenant une proportion donnée d'acides nucléiques. Cette méthode requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'onde : à 280 nm, pour les protéines, et à 260 nm, pour les acides nucléiques. Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation :

$$[\text{Protéines}] \text{ (mg/mL)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

---

# **CHAPITRE 3**

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## Résultats et Discussions

### 1 Caractérisation de la matière végétale

Les graines mûres, entières, sont appréciées selon les caractères organoleptiques comme leur taille, couleur, forme, texture, odeur et arôme. La qualité de la graine suit les critères des bonnes pratiques de fabrication relatifs à chaque pays, tels que la couleur et la saveur ainsi que l'absence de contamination microbienne, d'insectes, de matières étrangères et de composants toxiques. Les analyses chimiques portées sur les graines à l'état brut sont destinées pour la détermination du taux d'humidité, le taux de matière minérale, le taux de matière organique et le taux de matière sèche.

#### 1.1 Détermination du taux d'humidité

Les résultats obtenus ont montré un taux d'humidité de (7.6%). Des travaux antérieurs réalisés par (Soleiman *et al.*, 1999) ont rapporté une teneur des graines de Nigelle d'un taux d'humidité de (5.7%). Cependant, les résultats obtenus par ((Muhammad *et al.*, 2009) ont montré un taux d'humidité de (6.46 ± 0.17 %). De nombreux travaux réalisés sur l'étude du taux d'humidité de la Nigelle sont récapitulés dans le (Tableau 13). Les résultats obtenus se concordent avec ceux trouvés par les différents auteurs. Le taux d'humidité est fortement lié à la durée et le type de stockage des graines effectués.

**Tableau 13** : Pourcentage d'humidité des graines de *Nigella sativa* récoltées de différentes régions (Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007 ;Atta, 2003 ;Aksoy *et al.*, 2001).

Constituants	<i>Nigella sativa</i> Tunisienne*	<i>Nigella sativa</i> Iranienne*	<i>Nigella sativa</i> Egyptienne**	<i>Nigella sativa</i> turque***
Humidité	08,65%	04,08%	07%	06,40 à 09,40%

\* Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007.

\*\* Atta, 2003.

\*\*\* Aksoy *et al.*, 2001.

## 1.2 Détermination du taux de matière sèche

La matière sèche est constituée de matières minérales et de matières organiques qui sont appelées matières volatiles sèches. L'échantillon contient des substances volatiles qui vont s'évaporer avec l'eau et donc cette méthode ne permet pas d'effectuer une détermination fiable de la matière sèche. Le résultat obtenu est de **(92,4%) ce qui est normal** en raison de la faible teneur en eau.

## 1.3 Détermination du taux de matière minérale

L'analyse de cendres totales permet d'estimer la teneur en minéraux de la plante. La mesure de la matière minérale (MM) est déterminée par calcination de l'échantillon. Les résultats obtenus ont montré un taux de **(1,6%)** en matière minérale. Cependant, **(Muhammad et ses collaborateurs al., (2009)** ont rapporté une contenance des graines de *Nigella sativa* de **(4.20 %)** en matière minérale. De nombreux travaux réalisés sur l'étude du taux de matière minérale de la Nigelle sont résumés dans le **(Tableau 14)**.

**Tableau 14** : Pourcentage en cendre des graines de *Nigella sativa* récoltées de différentes régions **(Cheikh-Rouhou et al., 2007 ; Atta, 2003 ; Aksoy et al., 2001)**.

Constituants	<i>Nigella sativa</i> Tunisienne*	<i>Nigella sativa</i> Iranienne*	<i>Nigella sativa</i> Egyptienne**	<i>Nigella sativa</i> turquie***
Cendres	04,86%	04,41%	03,70%	02,40 à 07,80%

\* Cheikh-Rouhou et al., 2007.    \*\* Atta, 2003.    \*\*\* Aksoy et al., 2001.

## 1.4 Détermination du taux de matière organique

Le résultat obtenu a montré un taux de matière organique de **(90,67%)**. Le résultat paraît logique, vu que le taux d'humidité et de matière sèche sont faibles. Les différents travaux réalisés sur les graines de nigelle n'ont donné aucun résultat sur le taux de matière organique afin de faire une comparaison avec le résultat obtenu.

## 2 Examen phytochimique des graines de *Nigella sativa*

Les résultats d'analyse phytochimique réalisés sur les graines de la Nigelle par la méthode de réaction colorée a révélé la présence des composés suivants : des saponosides, des flavonoïdes et des alcaloïdes. Les résultats des différents tests réalisés pour la détection de ces métabolites selon les techniques citées dans le chapitre matériel et méthodes sont regroupés dans le (**Tableau 15**). Des travaux antérieurs réalisés sur la présence de métabolites secondaires dans les graines de *Nigella sativa* sont récapitulés ci-dessous.

**Tableau 15** : Présentation des résultats de l'analyse chimique de la graine de nigelle.

COMPOSES RECHERCHES	REACTIFS UTILISES	
	Ethanol	Eau Chaude
Alcaloïdes	Présence	—
Flavonoïdes	Présence	—
Saponosides		Présence

Les saponosides (**Taskin et al., 2005**).

Les Flavonoïdes (**Seyoum et al., 2006**).

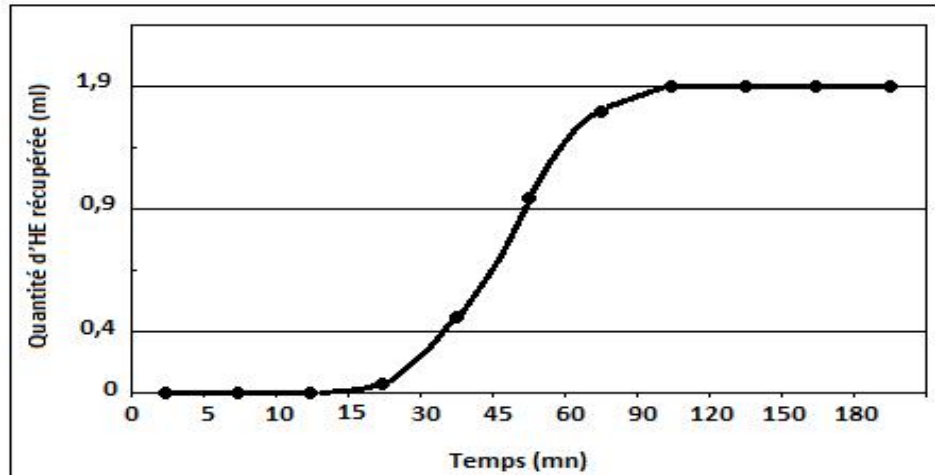
Les Alcaloïdes (**Das et al., 2010**).

## 3 Extraction de l'huile essentielle de *Nigella sativa*

### 3.1 Extraction de l' H.E à partir de l'huile végétale

L'huile essentielle de *Nigella sativa* est extraite par hydro-distillation à partir de l'huile végétale obtenue par pression à froid. Le suivi cinétique d'extraction accompli et l'évolution du rendement en fonction du temps est réparti en trois étapes (**Figure 15**).

Une première étape caractérisée par un rendement très faible et qui correspond à la phase de chauffage de la matrice. Une seconde étape, qui correspond à une augmentation considérable de la quantité d'HE récupérée (30-90mn). La dernière étape, qui correspond à un rendement maximum d'extraction des huiles essentielles.



**Figure 15** : Evolution du rendement en HE lors de l'hydrodistillation

### 3.2 Calcul du rendement

L'extraction par hydrodistillation d'huiles essentielles à partir de l'huile végétale a permis la récupération de **1.9 g** d'H.E à partir de **60 g** d'huile fixe. La quantité maximale d'huile fixe obtenue à partir des graines de nigelle est de l'ordre de **40 %**, alors que le minimum est de **30%** (**Tableau 16**). Par extrapolation on peut estimer le taux d'huile essentielle extraite à partir de l'huile végétale utilisée dans cette étude de la manière suivante :

**1-** Lorsque les graines utilisées ont données le maximum d'huile végétale (**40%**), le taux d'huile essentielle sera de l'ordre de **1, 2%** (HE) voir la formule.

$$60\text{g (HV)} \longrightarrow 1, 9\% \text{ (HE)}$$

$$40\text{g (HV)} \longrightarrow \mathbf{1, 2\% \text{ (HE)}}$$

**2-** Lorsque les graines utilisées ont données un taux moyen d'huile végétale (**35%**), le taux d'huile essentielle sera de l'ordre de **1, 09 %** (HE) voir la formule.

$$60\text{g (HV)} \longrightarrow 1, 9\% \text{ (HE)}$$

$$35\text{g (HV)} \longrightarrow \mathbf{1, 09\% \text{ (HE)}}$$

**3-** Lorsque les graines utilisées ont données un taux minimal d'huile végétale de (**30%**), le taux d'huiles essentielles sera de l'ordre de **0, 95 %** (HE) voir la formule.

$$60\text{g (HV)} \longrightarrow 1, 9\% \text{ (HE)}$$

$$30\text{g (HV)} \longrightarrow \mathbf{0, 95\% \text{ (HE)}}$$

**Tableau 16** : Présentation des teneurs en huile fixe et végétale de *Nigella sativa*.

Auteurs	Composition en huile fixe	Composition en huile essentielle
Hosseinzadah <i>et al.</i> , 2007	36 à 38%	0.4 à 2.5%
Ali et Blunden 2003	36 à 38%	1.4%
Burits et Bucar 2000	40%	1.4%
Benkaci <i>et al.</i> , 2006	35%	0.34%
Mehemet <i>et al.</i> , 2005	30%	1.4%
Hiller, 1999	38%	1.5%
Dominic <i>et al.</i> , 1991	31%	0.42%

Le rendement de l'huile essentielle est fortement lié à plusieurs facteurs à savoir l'espèce, la géographie, la période de récolte, les pratiques culturales, la technique d'extraction, etc. (Olle et Bender, 2010).

Dans ce présent travail, plusieurs facteurs sont ignorés notamment les conditions de culture, de récolte et en particulier les conditions et la durée de stockage des graines.

La séparation d'huiles essentielles après sa distillation est déterminée dans un premier temps, par son degré de solubilité dans l'eau. Lors de la récupération d'huiles essentielles à partir de l'hydrolysate, des gouttelettes sont observées, ce qui explique que le calcul du rendement est faussé (Lagunez Rivera, 2006). Les gouttelettes d'huile essentielle présentes dans l'hydrolysate peuvent avoir plusieurs origines, une fraction de l'huile distillée est dissoute dans l'eau et une autre est émulsionnée dans l'eau. La comparaison des résultats obtenus des huiles essentielles avec autres travaux réalisés a montré que la quantité d'huile essentielle dans la graine varie entre 0,4 à 2,5%, dont le constituant majeur est la thymoquinone, qui représente une concentration de 30% de l'huile essentielle. Peter, 2004). Rathee *et ses collaborateurs al.*, (1982) ont rapporté que les graines de *N. sativa* contiennent une concentration comprise entre 0,4- 0,5 % d'HE.

## 4 Etudes physico-chimiques de l'HE de *N.sativa*

### 4.1 Caractères organoleptiques de l'HE de *N.sativa*

La valeur commerciale d'une huile essentielle est estimée dans la plupart du temps par ses qualités organoleptiques, auxquelles s'ajoutent un certain nombre de constantes appelées « Indices », déterminés à partir des normes AFNOR établies. Les caractères organoleptiques des huiles essentielles dépendent principalement de trois critères : l'aspect, la couleur et l'odeur qui eux même dépendent de l'origine de la plante, des techniques d'extraction utilisées, de la conservation etc. Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle extraite à partir de l'huile végétale "Miracle" est de couleur jaune brun avec une odeur prononcée. Par ailleurs, les caractères organoleptiques de l'huile essentielle "Miracle" sont conformes aux différents résultats répertoriés dans plusieurs publications ayant étudié l'HE de la Nigelle. (**Tableau 17**).

**Tableau 17** : Caractères organoleptiques de l'H.E extraite à partir de l'H.V.

Huile Essentielle	Caractéristiques organoleptiques			
	Aspect	Couleur	Odeur	Saveur
<i>Nigella sativa</i>	liquide mobile	jaune-brun à marron- clair	Aromatisée et prononcée	Piquante très caractéristique

### 4.2 Caractères physico-chimiques de l'H.E extraite à partir de l'H.V

Les HE doivent répondre à un certains nombres de critères physiques, tels que l'état liquide à température ambiante, de consistance huileuse, avec une densité inférieure à celle de l'eau, volatiles, solubles dans les huiles végétales et les solvants organiques usuels. Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles constituent un paramètre majeur dans la détermination de la qualité de l'huile essentielle.

Une huile essentielle de très haute qualité présente une densité relative et un pouvoir rotatoire plus élevé avec un indice de réfraction très bas. La densité relative inférieure à 1 constitue un critère d'évaluation de la qualité des H.E. très important dans différents



domaines de la vie (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire, chimique, etc..). L'indice de réfraction varie considérablement selon la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donne un indice de réfraction très élevé. (Kanko *et al.*, 2004) ont rapporté qu'un faible indice de réfraction de huiles essentielles indique sa faible réfraction de la lumière, ce qui favorise son utilisation dans la fabrication des produits cosmétiques. L'analyse du pouvoir rotatoire indique lorsque les huiles essentielles sont dextrogyres ou lévogyre, ce qui présente un critère important dans la détermination de la pureté des huiles essentielles. Les résultats obtenus ont montré que le pouvoir rotatoire des huiles essentielles a une valeur de  $+4^{\circ}/+8^{\circ}$ , ce qui explique que cette huile est dextrogyre. Il en ressort de ces résultats que la totalité de ces constituants sont considérablement influencées par les conditions édaphiques et climatiques et les pratiques culturales (Lis-balchin, 2002). Par ailleurs, les résultats obtenus de la détermination des propriétés physico-chimiques sont répertoriés sur le (Tableau 18).

**Tableau 18** : Détermination des caractères physico-chimiques de l'huile essentielle extraite à partir de l'huile végétale.

CARACTÈRES PHYSICO-CHIMIQUES	H.E DE <i>NIGELLA SATIVA</i>
DENSITÉ RELATIVE	0.921
POUVOIR ROTATOIRE	$+4^{\circ}/+8^{\circ}$
INDICE DE RÉFRACTION	1.475
MISCIBILITÉ À L'ÉTHANOL	10V

## 5 Matériel biologique

### 5.1 Purification des souches bactériennes

L'identification des souches a été réalisée selon les recommandations de (Hammes et Hertel, 2006). La coloration de Gram a été effectuée pour les souches cliniques et non pas pour les souches référencées ce qui a permis de distinguer pour le premier groupe cinq (5) souches Gram négatif (*E.coli* ATTC 25922, *Proteus sp*, *Entérobacter sp*, *Klebsiella* et *Pseudomonas aéruginosa* ATTC 27853) et une (1) souche Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATTC 25923). Les deux souches fongiques

testées sont des Gram positif (*Candida albicans* et *Rhodotorula*). Le deuxième groupe comprend cinq bactéries Gram négatif (*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio cholérique*, *Salmonella paratyphi a*, et *Pseudomonas aeruginosa*, Quatre (4) Gram positif (*Staphylococcus epidermis*, *Bacillus cereus*, *Listeria sp* et *Enterococcus faecalis*). La plupart des bactéries aérobies strictes possèdent l'enzyme de la catalase, en particulier les bacilles Gram négatif. La mise en évidence de la présence ou l'absence de cet enzyme constitue une étape indispensable pour l'identification bactérienne. Les résultats obtenus sont illustrés dans le (**Tableau 19 et 20**).

Le test de l'oxydase est mis en évidence pour l'identifier en particulier des bacilles à Gram négatif. Les résultats obtenus sont illustrés dans le (**Tableau 19 et 20**). *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Vibrio cholera* ont présenté une réaction positive vis-à-vis de cette enzyme, cependant, toutes les autres souches testées ont manifesté une réaction négative contre cette enzyme. Le test de coagulase constitue une étape indispensable pour l'identification de *Staphylococcus aureus* pathogène. *Staphylococcus aureus* est inoculée dans des tubes à essai contenant un milieu de culture liquide de T.S.A ou de cœur-cerveau, incubée à une température de 37°C pendant 18-24 heures. Des tubes à hémolyse contenant du plasma de lapin sont inoculés avec *Staphylococcus aureus*, incubés à une température de 37°C pendant quelques heures. La lecture positive se traduit par la coagulation du plasma de lapin. Toutes les bactéries ont présenté un résultat positif à l'enzyme de catalase sauf *Enterococcus faecalis*. La mobilité n'est observable que chez la majorité des bacilles. Le type respiratoire va de l'anaérobie facultatif (*Enterococcus faecalis*) en passant par l'aéro-anaérobie-facultatif (la majorité des souches testées) jusqu'à l'aérobie strict pour (*Pseudomonas aeruginosa*).

**Tableau 19 :** Tests d'identifications des souches bactériennes (1<sup>er</sup> groupe)

BACTÉRIES	Cat	OXY	Coagulase	Gram	Mobilité	Forme	Type respiratoire
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	Mobile	Bacille	Aère-anaero Fac
<i>Enterobacter</i>	+	-	-	-	Mobile	Bacille	Aère-anaero Fac
<i>Proteus</i>	+	-	-	-	Mobile	Bacille	Aère-anaero Fac
<i>Klebsiella</i>	+	-	-	-	Immobile	Bacille	Aère-anaero Fac
<i>Pseudomonas.a</i>	+	+	-	-	Mobile	Bacille	Aère-strict
<i>St.aureus</i>	+		+	+	Immobile	Cocci	Aère-anaero Fac

**Tableau 20 :** Tests d'identifications des souches bactériennes (2<sup>er</sup> groupe)

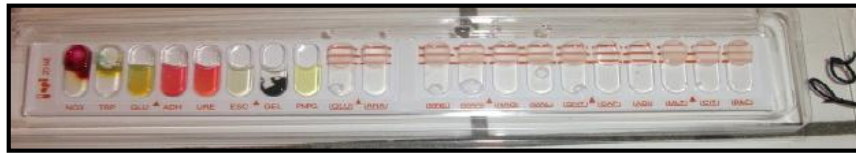
BACTÉRIES	Cat	OXY	Coagulase	Gram	Mobilité	Forme	Type respiratoire
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	Mobile	Bacille	Aère-anaero Fac
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	+	Immobile	Cocci	anaéro Fac
<i>Salmoella Paratyphi a</i>	+	-	-	-	Immobile	Bacille	Aère-anaero Fac
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	-	Mobile	Bacille	Aère-anaero Fac
<i>Pseudomonas.a</i>	+	+	-	-	Mobile	Bacille	Aère-strict
<i>Staphylococcus epidermis</i>	+		-	+	Immobile	Cocci	Aère-anaero Fac
<i>Bacillus cereus</i>	+	+/-	-	+	Mobile	Bacille	Aère-anaero
<i>Vibrio cholera</i>		+	-	-	Mobile	Bacille	Aère-anaero
<i>Listeria sp</i>	+	-	-	+	Immobile	Bacille	Aère-anaero

### 5.1.1 Identification biochimique des souches bactériennes

L'identification biochimique des différentes souches est réalisée par des galeries API appropriées. A l'heure actuelle, ces techniques traditionnelle sont progressivement suppléées par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, qui permet une identification plus rapide et fiable (**Figure 16**).



*Enterobacter sp*

*Ps.aeruginosa**Bacillus cereus**Salmonella*

**Figure 16 :** Illustration des résultats de l'identification des souches à l'aide des galeries API.

## 5.2 Purification des souches fongiques

Les souches fongiques utilisées dans ce présent travail nous ont été aimablement fournies par l'unité de mycologie du laboratoire central du CHU de Sidi Bel Abbès. Les principaux caractères différentielles entre les deux souches levuriennes *candida sp* et *rhodotorula sp* sont assignées dans le (**Tableau 21**). Le milieu sabouraud est utilisé pour la mise en évidence de l'activité antifongique (**Rasooli et al., 2008**). Des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture de Sabouraud sont ensemencées à partir d'un inoculum préalablement préparé et dans la concentration est de  $10^6$  UFC/ml. Dans des conditions aseptiques, les disques de papier Wattman ont été déposés sur la gélose, précédemment inoculé avec les champignons à tester. Les disques sont ensuite imbibés avec différentes concentrations d'huile essentielle de la Nigelle. Les boites maintenues à température ambiante pendant 20 minutes sont incubées à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 2 à 7 jours.

**Tableau 21** : Tests d'identification des souches fongiques.

Champignons	Couleur Et Forme des colonies sur gélose Sabouraud	Test de Bastésé	Mycellium
Candida albicans	Crème et lisse	+	Présence
Rhodotorula	Rose et Lisse	-	Absence

## 6 Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de *N. sativa*

### 6.1 Evaluation de l'activité antibactérienne de l'H.E extraite à partir de l'huile végétale par la méthode de l'aromatogramme

**Tableau 22** : Illustration du test d'aromatogramme des souches testées (méthode classique) (diamètres d'inhibition en mm).

Bactéries	Témoin	<i>E.coli</i>	<i>Proteus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Entero robact</i>	<i>Staphyl aureus</i>	<i>Pseudom</i>
1 µl	0	1	6,5	7	0	10	0
2 µl	0	7	9	7	9	24	0
4 µl	0	8	10	8	9	26	0
6 µl	0	12	14	10	11	26	8
8 µl	0	12	14	10	13	29	10
12 µl	0	12	14	13	15	32	13



**Figure 17 :** Illustration du test d'aromatogramme chez *Proteus*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de différentes concentrations d'huile essentielle de *Nigella sativa*.

Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées. Cette technique pose un problème de diffusion, d'homogénéité et de dispersion avec les HE, qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux. Problème résolu partiellement par l'utilisation de différents émulsifiants tels que le Tween 20, le Tween 80 ou le DMSO. La plupart des méthodes utilisées ont été critiquées par plusieurs auteurs (**Narashima et al., 1972**).

Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que la sensibilité d'un même germe vis-à-vis d'une même HE diffère selon la méthode utilisée ou selon le mode de dispersion de l'HE dans le milieu de culture, ce qui rend toute comparaison inexacte et pousse les chercheurs à bien choisir et améliorer les techniques d'étude. La variation de la densité bactérienne de l'inoculum utilisée et la difficulté à déterminer le meilleur agent émulsifiant pour avoir des proportions minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) reproductibles et comparables entre les différents manipulateurs constitue des problèmes majeurs.

D'autre part la grande variabilité des huiles essentielles qui ne sont jamais identiques à elles-mêmes (**Belaiche, 1979**). Donc l'aromatogramme n'est qu'un test in-vitro et pas in-vivo, en pratique l'huile essentielle n'a pas toujours le même comportement in-vivo qu'in-vitro (**Lapraz et Duraffourd, 2002**). Deux facteurs essentiels doivent être pris en compte afin d'apprécier la valeur des résultats de l'aromatogramme. D'après les résultats

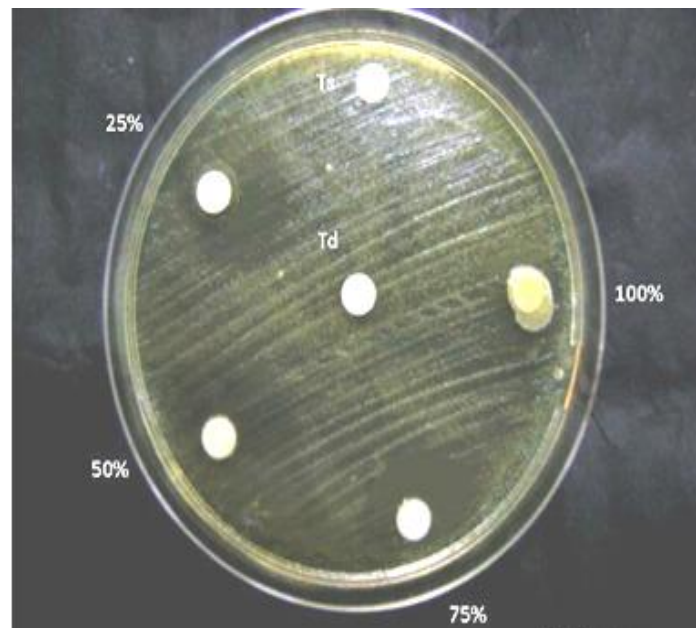
obtenus (**Tableau 22**) l'HE extraite à partir de l'huile végétale de la nigelle semble jouir d'une activité inhibitrice acceptable sur les différentes classes de microorganismes testés. *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible à l'huile essentielle avec un diamètre d'inhibition de 32mm pour une concentration de  $12 \mu\text{l.ml}^{-1}$ . Toutes les autres souches sont sensibles à l'huile essentielle à partir d'une concentration supérieure à  $08\mu\text{l.ml}^{-1}$ . *Pseudomonas* étant la souche la plus résistante à l'huile essentielle de la nigelle. En dépit de la présence d'un grand nombre de publications relatives à l'efficacité in vitro des huiles essentielles contre les microorganismes multirésistants, il y a un manque important de la recherche dans leur efficacité in vivo, soit sur des animaux de laboratoire ou dans l'application clinique (**Kon et Rai, 2012**).

**Tableau 23** : Illustration du test d'aromatogramme des souches testées (Méthode des pourcentages, %) (Diamètres d'inhibition en mm).

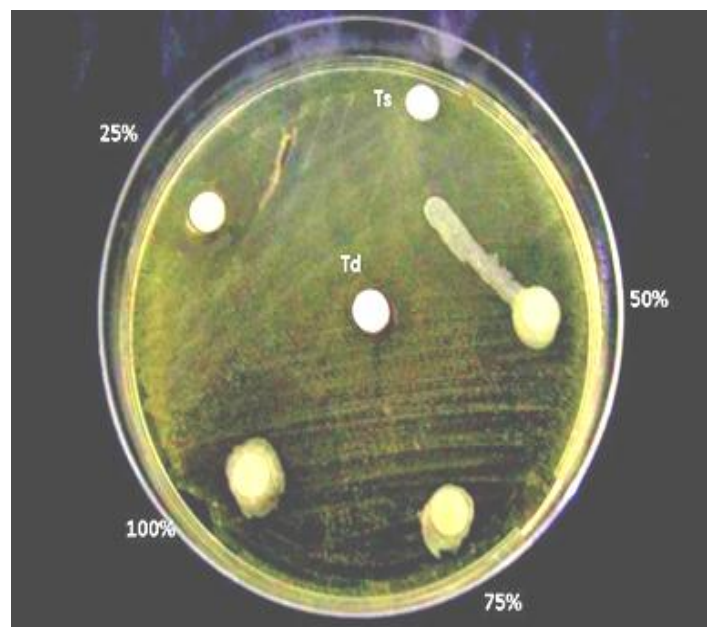
Bactérie	Nature des substances testées					
	Les huiles essentielles de <i>Nigella sativa L</i>				Tween 80	Disque sec
	100%	75%	50%	25%		
<i>E. coli</i>	20,3	16,6	13	8,3	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24,6	18	15,3	13,3	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	20	13,3	11,3	9	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	31	27,5	22	18	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	27,6	26,6	22	10	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	10	9	0	0	0
<i>Salmonella paratyphi a</i>	30	27	21	13	0	0
<i>Listeria sp</i>	25	21	20	15	0	0
<i>Vibron cholérique</i>	32	28	20	15	0	0

Les résultats de l'aromatogramme par la méthode des pourcentages (%) sont meilleurs que ceux de l'aromatogramme par la méthode classique, puisque les concentrations en huile essentielle sont plus grande. L'exemple de 100% c'est  $1000 \mu\text{l /mm}$ , ce qui est énorme. On constate que toutes les souches bactériennes sont sensibles à la concentration de 100 et 75%, meme *Pseudomonas aeruginosa*. Apartir de 50% *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* montrent une résistance à activité inhibitrice de l'huile essentielle. Pour la concentration de 25% et en plus des bactéries citées on voit

que *E. coli* et *Enterococcus faecalis* présentent une résistance à activité inhibitrice de l'huile essentielle.



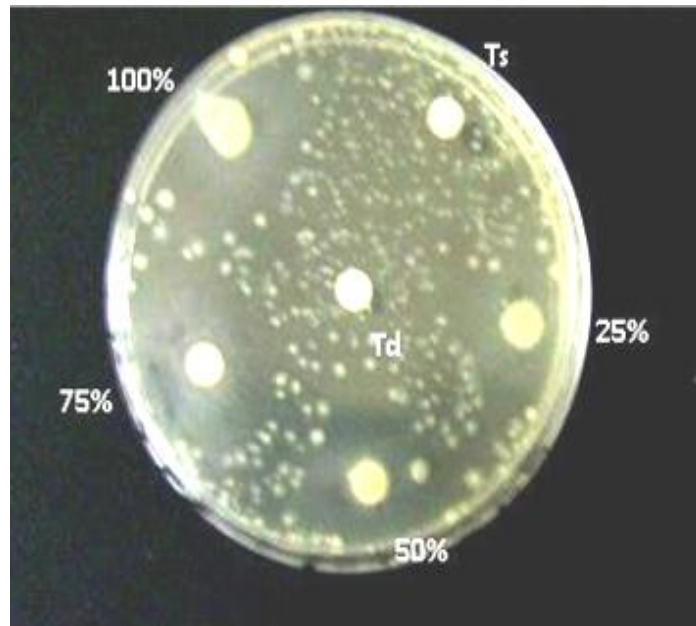
**Figure 18 :** L'inhibition de la croissance de *Vibrion cholérique* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle (100, 75, 50, 25%) sur le milieu de culture de Muller Hinton (Aromatogramme).



**Figure 19 :** L'inhibition de la croissance de *Salmonella paratyphi a* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle



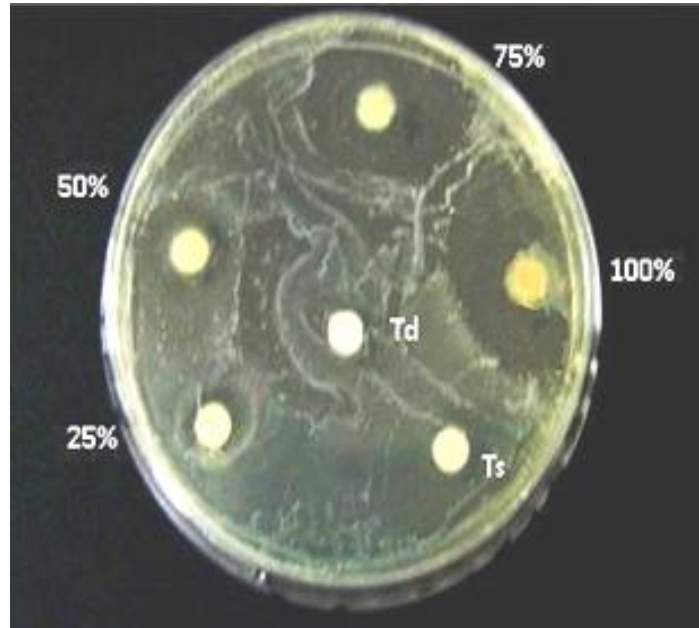
(100, 75, 50, 25 %) sur le milieu de culture de Muller Hinton (Aromatogramme).



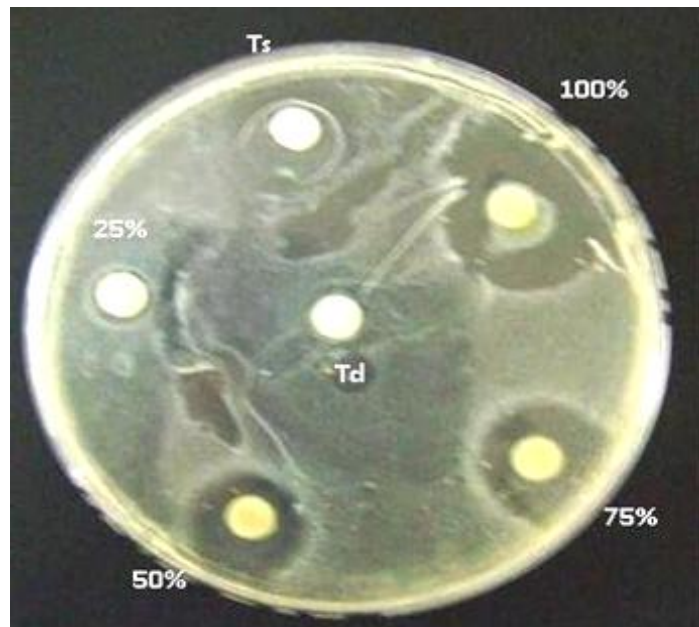
**Figure 20 :** L'inhibition de la croissance de *Bacillus cereus* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle (100,75, 50, 25 %) sur le milieu de culture de Muller Hinton (Aromatogramme).



**Figure 21 :** L'inhibition de la croissance de *Listéria sp* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle (100, 75, 50, 25%) sur le milieu de culture de Muller Hinton (Aromatogramme).

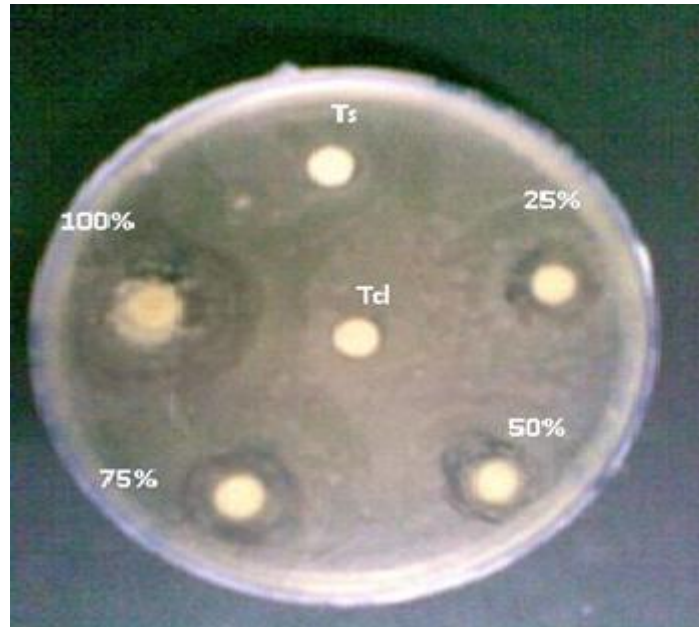


**Figure 22 :** L'inhibition de la croissance de *Streptococcus faecalis* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle (100, 75, 50, 25 %) sur le milieu de culture de Muller Hinton(Aromatogramme).

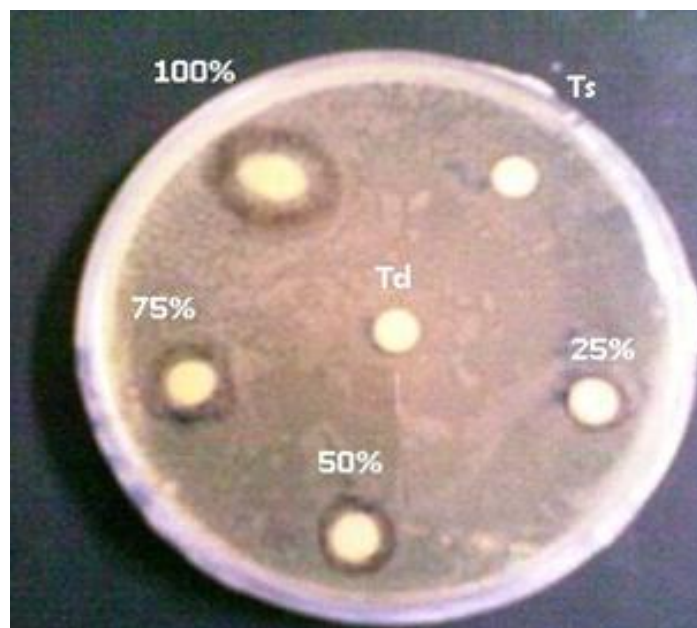


**Figure 23 :** L'inhibition de la croissance de *Staphylococcus epidermidis* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle

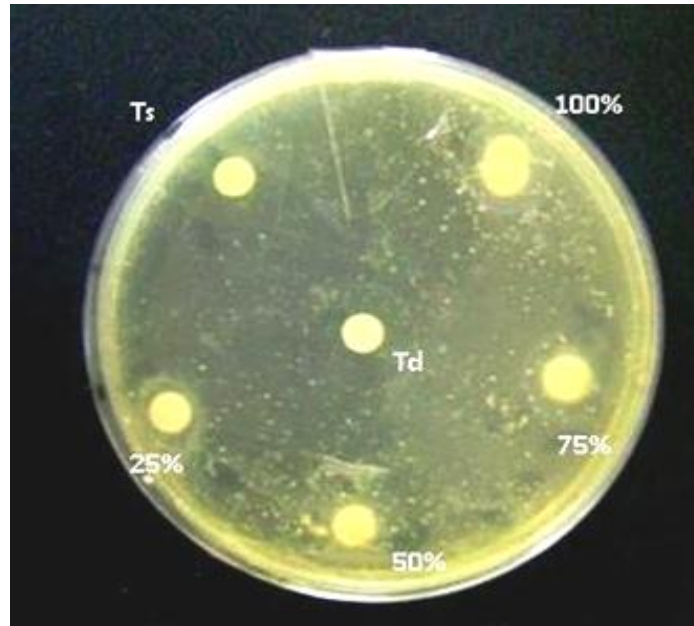
(100, 75, 50, 25 %) sur le milieu de culture de Muller Hinton (Aromatogramme).



**Figure 24 :** L'inhibition de la croissance d'*E. coli* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle (100, 75, 50, 25 %) sur le milieu de culture de Muller Hinton (Aromatogramme).



**Figure 25 :** L'inhibition de la croissance de *Proteus mirabilis* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle (100, 75, 50, 25%) sur le milieu de culture de Muller Hinton (Aromatogramme).



**Figure 26 :** L'inhibition de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle (100, 75, 50, 25 %) sur le milieu de culture de Muller Hinton (Aromatogramme).

## 6.2 Détermination de la CMI sur milieu de culture liquide

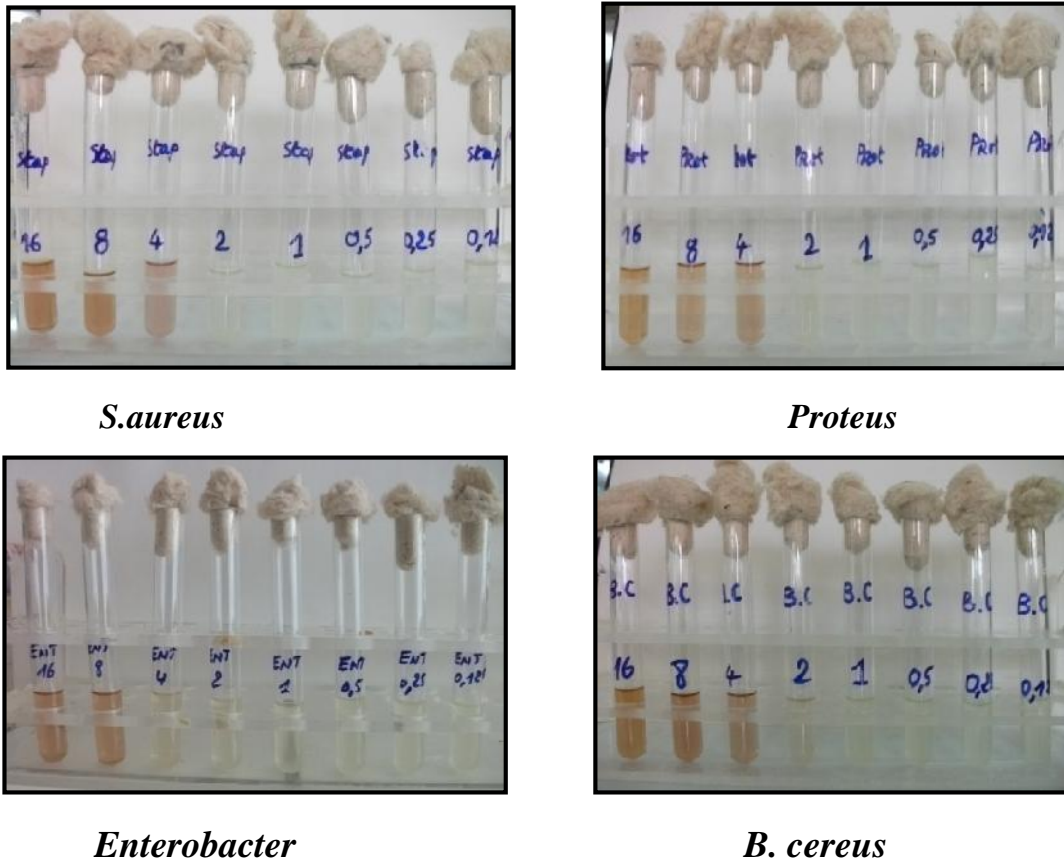
La méthode de dilution sur milieu de culture liquide est très pratique et les résultats obtenus sont d'une manière générale très fiable. Lors d'étude de l'activité antibactérienne, les huiles essentielles peuvent être mélangées à des concentrations définies avec des milieux de culture liquide et solide. Le milieu de culture est ensuite inoculé avec une suspension bactérienne d'une densité optique initiale déterminée, incubé à une température favorable à la prolifération pendant un intervalle de temps défini. La lecture est procédée par la mesure de la turbidité à une longueur d'onde définie à l'aide d'un spectrophotométrique car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (Ferhat, 2004).

Les résultats obtenus des différentes concentrations inhibitrices (**Tableau 24**) ont montré que la CMI de *S.aureus* est très proche de 10  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ , Cependant, celle de *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsilla* et *E.coli* est comprise entre 10  $\mu\text{l.ml}^{-1}$  et 50  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ . Quant à *P.aeruginosa* la CMI est comprise entre 50  $\mu\text{l.ml}^{-1}$  et 100  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ . Des travaux antérieurs réalisés par (**Koba et al., 2004, Pibiri , 2005**) ont montré que lorsque la valeur de la CMI < 50 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ , le pouvoir inhibiteur est excellent. D'une manière générale, les huiles essentielles de la nigelle ont manifesté un est excellent pouvoir d'inhibition vis-à-vis de *S.aureus*, d'*Enterobacter*, de *Proteus*, de *Bacillus* et d'*E.coli*, et faible vis-à-vis de *P. aeruginosa*.

**Tableau 24** : Détermination de la CMI sur milieu de culture liquide de l'huile essentielle de *Nigella sativa* chez les souches testées.

Souches tests ----- Volume	Témoin	<i>E.coli</i>	<i>Klebsilla</i>	<i>Proteus</i>	<i>Entero-Bacter</i>	<i>Ps. aerugi</i>	<i>St aureus</i>
10 $\mu\text{l}$	--	+	+	+	+	+	+
50 $\mu\text{l}$	--	++	++	++	++	+	++
100 $\mu\text{l}$	--	+++	+++	+++	+++	++	+++

+++ : Inhibition totale (milieu limpide). + : Faible inhibition. ++ : Inhibition assez importante.  
-- : Pas d'inhibition



**Figure 27 :** Tests de la détermination de la CMI sur milieu de culture liquide de *S.aureus*, *Proteus*, *Enterobacter*, *B. cereus*.

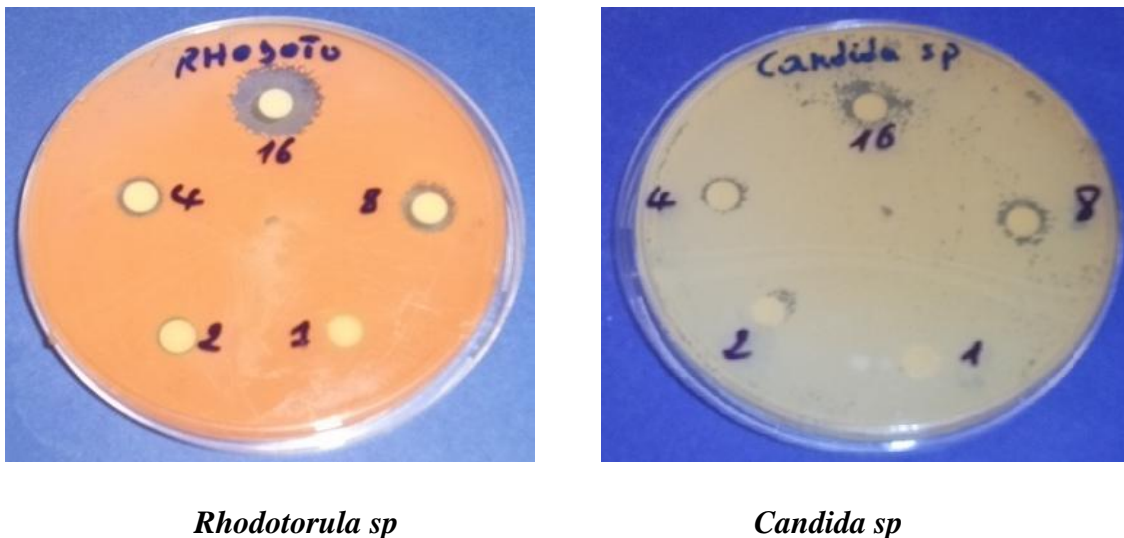
### 6.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide

L'absence de la turbidité et de changement de coloration de la rézurine lors de l'inoculation d'une suspension bactérienne dans un volume de 0,2 ml de milieu de culture PCA ou Mueller-Hinton, incubé à une température de à 37°C pendant 24 heures a montré que les valeurs obtenues de la détermination CMB chez la totalité des souches testées sont double de celle de la CMI, ce qui explique que les huiles essentielles de *Nigella sativa* ont manifesté un effet bactériostatique et bactéricide selon le micro-organisme mis en cause. **Mohamed et ses collaborateurs al., (1974)** ont démontré que la CMB peut être égale a la CMI ou même supérieure (**Alam et al., 2010**).

## 6.4 Evaluation de l'activité antifongique par la méthode de l'aromatogramme

L'activité antifongique des huiles essentielles est due essentiellement à leur composition en molécules bioactives variées, appartenant à différentes classes chimiques, pouvant être mises à profit pour réduire la flore fongique contaminante (Ouraini *et al.*, 2005). Un large spectre de classe des composés a été purifié et a démontré des propriétés antifongiques (De Lucca *et al.*, 2005 ; Marzouk *et al.*, 2009).

Les résultats obtenus de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Nigella sativa* vis-à-vis de certaines souches fongiques a montré une importante sensibilité de la souche *Rhodotorula* à une concentration supérieure à 16  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ . Cependant, la souche de *Candida sp* a présenté une importante résistance vis-à-vis des les huiles essentielles de la nigelle (Figure 28).



**Figure 28:** Le test d'aromatogramme de *Candida sp* et de *Rhodotorula* vis-à-vis de différentes concentrations d'HE de *Nigella sativa*.

## 6.5 Evaluation de l'activité antibactérienne de l'hydrolat par la méthode de l'Aromatogramme

Le **Tableau 25** d'après (**Sagdiç et al., 2003**) indique plusieurs exemples d'hydrolats d'épices vis-à-vis des bactéries pathogènes. De nombreux hydrolats ont exercé des activités biologiques très intéressantes par rapport aux huiles essentielles correspondantes.

L'utilisation du procédé d'extraction de l'huile essentielle de *Nigella sativa* par hydrodistillation, a permis la récupération de 400 ml d'hydrolat afin d'extraire les composés volatils. Des extractions liquide-liquide successives avec de l'hexane ont été effectuées, après séchage sur magnésium de sulfate anhydre, filtration et évaporation du solvant sous pression réduite, a permis la récupération un volume de 0,4 ml d'hydrolat concentré. L'hydrolat récupéré présente une odeur très forte et un aspect huileux très visqueux. Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle extraite à partir de l'hydrolat de *Nigella sativa* vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes testées sont illustrés dans les (**Figure 29 et 30**). L'augmentation du diamètre d'inhibition d'*E. coli* augmente avec la concentration d'huile essentielle. Pour 8µl, on a un diamètre de 11mm, pour 62 µl, on a un diamètre de 15mm. Concernant *Staphylococcus aureus* la concentration en huile essentielle de 125 µl a donnée une zone d'inhibition très intéressante, supérieur à 30mm.

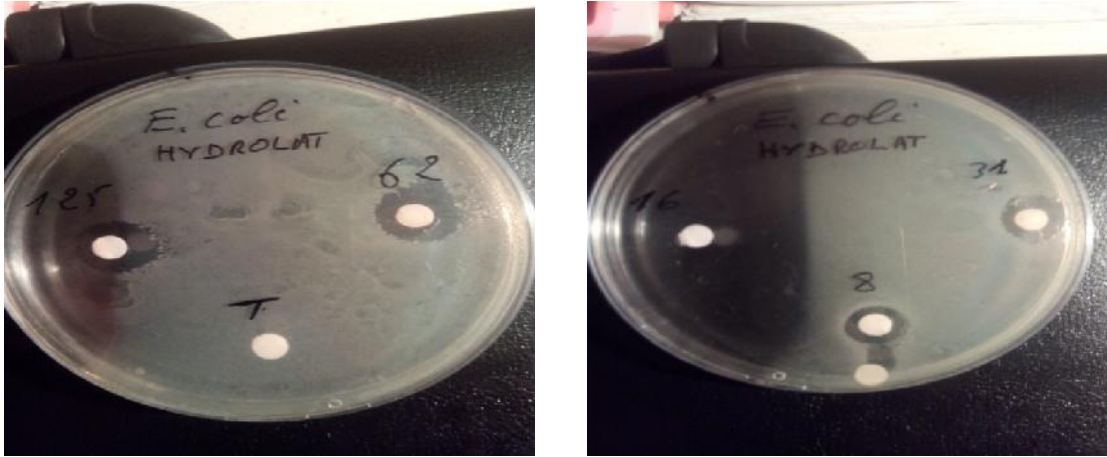


**Tableau 25** : Activité antibactérienne d'hydrolats d'épices vis-à-vis les bactéries pathogènes (Sagdiç *et al.*, 2003).

Bactéries	Diamètre de la zone d'inhibition en mm (diamètre disque = 5 mm)				
	Anis	Cumin	Origan	Sarriette	Thym
<i>B. amyloliquwfaciens</i> ATCC 3842	---	---	27	14	12
<i>G. Brevis</i> FMC 3	---	14	15	15	16
<i>fi. cereus</i> FMC 19	---	---	14	15	15
<i>B. subtilis var.nlger</i> ATCC 10	---	---	20	14	---
<i>F. aerogenes</i> CCM 2531	---	26	14	16	---
<i>£ coli</i> ATCC 25922	9	---	16	18	13
<i>£ coli</i> O 157:H7 ATCC 33150	---	19	19	10	---
<i>K. pneunomoniae</i> FMC 5	---	--	20	16	---
<i>P. vulgaris</i> FMC 1	---	--	19	16	14
<i>S. entendis</i>	---	---	15	17	14
<i>S gallinanim</i>	---	---	14	16	14
<i>S. typhymurium</i>	---	---	20	15	---
<i>S. aureus</i> ATCC 2392	---	---	33	18	---
<i>S. aureus</i> ATCC 28213	12	---	15	16	10
<i>V. enterocolitica</i> ATCC 1501	---	---	16	17	13



**Figure 29** : L'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle extraite à partir de l'hydrolat (8µl, 16 µl, 31 µl, 62 µl, 125 µl) sur le milieu de culture de Muller Hinton (Aromatogramme).



**Figure 30 :** L'inhibition de la croissance d'*E. coli* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle extraite à partir de l'hydrolat (8  $\mu$ l, 16  $\mu$ l, 31  $\mu$ l, 62  $\mu$ l, 125  $\mu$ l) sur le milieu de culture de Muller Hinton (Aromatogramme)

## 7. Etude comparative entre l'antibiogramme et l'aromatogramme

Les résultats obtenus sont exprimés comme sensibles (S), intermédiaires (I) et résistantes (R) selon les normes recommandées (Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2007). La sensibilité aux antibiotiques est étudiée par la méthode de diffusion sur milieu de culture solide (méthode des disques), qui permet la détermination de la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques (Cavallo, *et al.*, 2007). Selon la recommandation du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM), le choix des antibiotiques testés sur les différentes espèces bactériennes isolées, repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques et d'autre part sur le spectre d'activité de chaque antibiotique (Tableau 26). Les souches testées sont en majorité d'origine clinique, ce qui suggère leur probable résistance vis-à-vis des agents antimicrobiens classiques. Les souches cliniques isolées, identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie du centre hospitalo-universitaire de Sidi Bel-Abbés ont été testées vis-à-vis des antibiotiques disponibles. Onze antibiotiques disponibles au niveau du laboratoire de bactériologie du CHU de Sidi Bel-Abes ont été testés vis-à-vis de sept (6) souches bactériennes.

- 11 antibiotiques pour *Staphylococcus aureus*.
- 09 antibiotiques pour *Pseudomonas aeruginosa*.
- 07 antibiotiques pour les Entérobactéries.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le (Tableau 26) ont permis de faire les constatations suivantes, la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques due principalement à leur capacité de former des biofilms dans des états physiologiques spécifiques à leur situation. En outre, la membrane externe constitue par sa structure spéciale une barrière à un grand nombre de biocides. *E.coli* est sensible à 100% des antibiotiques testés, *Proteus* est résistant à 48% des antibiotiques testés, *Klebsiella* est résistante à 71% des antibiotiques testés, *Enterobacter* est résistant à 85% des antibiotiques testés. Malgré que les Entérobactéries appartiennent à la même famille elles se comportent d'une manière très différente vis-à-vis des antibiotiques testés. *Staphylococcus aureus* présente une résistance vis-à-vis de 72% des antibiotiques testés.

**Tableau 26 :** Le test d'antibiogramme chez certaines souches pathogènes.

ATB	<i>E.coli</i>	<i>Salmonela</i>	<i>Proteus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Entero-bacter</i>	<i>Staphylo-Coccus</i>	<i>Listéria</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudo monas</i>
OX						R			
AMP		19	24	R	26		25	24	R
FA						R			R
L						R			R
PT						R			R
RA						10			
AML	22	21	15	R	21		22	21	
TE		R	R	R	18		15	R	R
CT	23	R	R	R	20		R	R	R
E									
AK	26	25	18	22	22	R	R	R	15
SP						24			
DO	18	11	R	R		R	R	15	R
P						21			
VA						R			
CL	25	11	11	18	R	R	R	R	R

OX : OXACILLINE, AMP : AMPICILLINE FA : ACIDE FUSIDIQUE, 0.0L : LINCOMYCINE,  
 CT : COLISTINE, PT : PRISTINAMICINE, AML : AMOXYCILLINE, RA : RIFAMPIN,  
 TE : TETRACYCLINE, P : PENICILLINE, SP : SPIRAMICINE, E : ERYTHROMYCINE  
 SP : SPIRAMICINE, VA : VANCOMYCIN, DO : DOXYCYCLINE, CL : CEPHACIXINE,

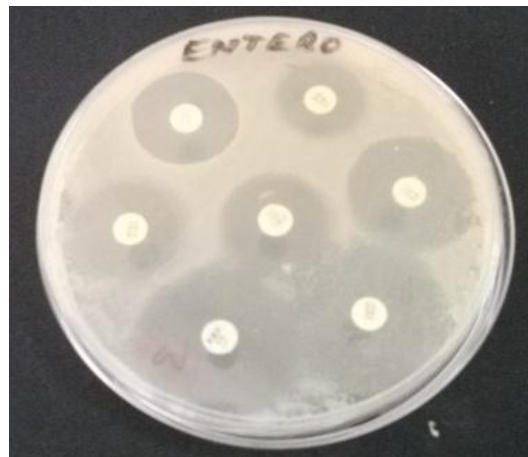
AK : AMTKACINE.



*Escherichia coli*



*Salmonella. sp*



*Enterobacter*

**Figure 31** : Illustration du test d'antibiogramme chez *Enterobacter*, *Salmonella* et *E. coli* vis-à-vis d'une large gamme d'antibiotique..

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules (MM < 500 Da) dotées pour la plupart d'une activité antibactérienne. D'une manière générale, cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (Tegos *et al.*, 2002 ; Lewis et Ausubel, 2006). Les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont donc plus élevées des molécules isolées de plantes par rapport à celles issues de bactéries et de champignons. En effet, une molécule phytochimique est considérée comme « antimicrobienne » lorsqu'elle inhibe la croissance des micro-organismes à des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 100 et

1 000 µg/mL. Les antibiotiques d'origine microbienne, présentent des CMI de 0,01 à 10 µg/ml, (Tegos *et al.*, 2002). Le spectre d'action des molécules antimicrobiennes produites chez les plantes est plus restreint par rapport à celles générées par les antibiotiques conventionnels.

**Tableau 27** : Etude comparative de l'activité anti-bactérienne de l'huile essentielle et végétale de Nigelle avec deux antibiotiques (Rathee *et al.*, 1982).

Bactéries	Zone d'inhibition en mm			
	Pénicilline	Streptomycine	Huile essentielle	Huile végétale
<i>Escherichia coli</i>	--	22	16	10
<i>Bacillus anthracis</i>	20	--	20	15
<i>Salmonella typhi</i>	--	17	22	8
<i>Bacillus subtilis</i>	24	--	20	10
<i>Corynebacterium pyrogene</i>	24	--	20	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	22	28	9
<i>Proteus vulgaris</i>	--	18	18	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	26	--	26	10
<i>Shigella shigae</i>	--	22	26	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	--	22	20	12

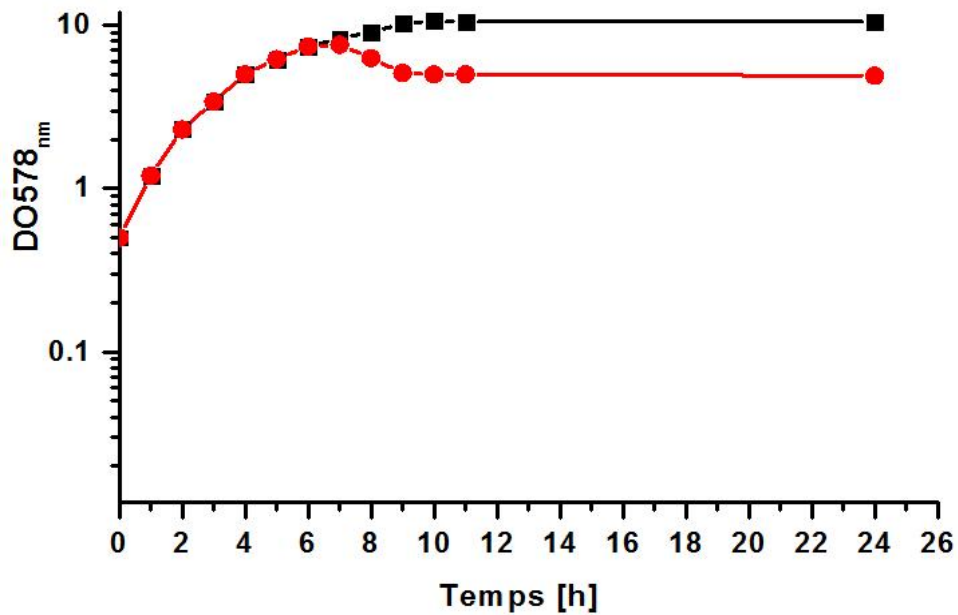
## 8. La cinétique de croissance bactérienne en présence et en absence d'huile essentielle de *N.sativa*

L'estimation de la croissance bactérienne en fonction du temps est basée sur deux critères, la masse cellulaire et le nombre de bactéries qui augmentent dans des proportions variables au cours de la croissance. L'interprétation des courbes de croissance obtenues par spectrophotométrie n'est cependant pas immédiate pour deux raisons : la Densité optique permet de mesurer la biomasse de la culture et non directement sa concentration en cellules viables et cette densité n'est mesurable que lorsque la concentration de la culture atteint un certain seuil qui varie de  $10^5$ - $10^7$  cellules

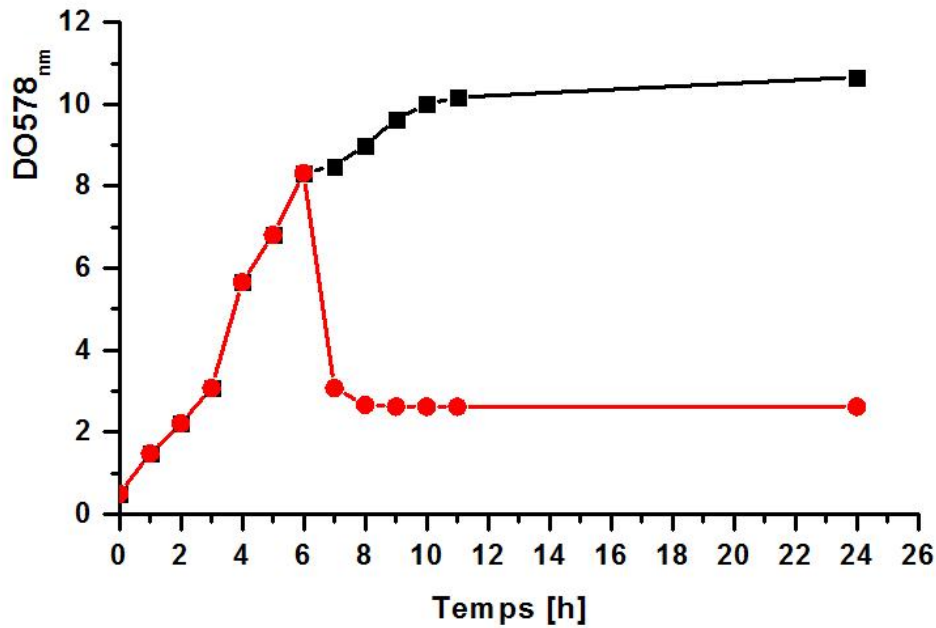
par ml en fonction du micro-organisme étudié. La masse cellulaire est mesurée selon la densité optique du milieu, ceci permet de décrire la courbe de croissance de la bactérie. Tandis que le nombre de bactéries viables devrait être estimé d'après le nombre d'unité formant colonie sur milieu de culture solide, ensemencé à partir de suspensions diluées en séries. La détermination de la cinétique bactérienne est effectuée sur milieu de culture liquide par mesure de la densité optique d'une suspension bactérienne, inoculée, incubée à une température de 37°C pendant 18- 24 heures, à une longueur d'onde de 578 nm. L'étude du suivi de la cinétique de croissance est réalisée sur les souches témoins de l'activité inhibitrice en présence et en absence des huiles essentielles extraites par hydrodistillation de *Nigella sativa*. Les courbes de la mesure de la densité optique en fonction du temps généralement représentent trois phases de croissance: la phase de latence étalé sur les trois premières heures (0h-3h) dont les souches ayant développées une adaptation avec le milieu de culture; la phase exponentielle qui se déroule entre 3h et 18h où s'effectue la multiplication des cellules bactériennes et finalement la phase stationnaire de 18h à 48h. Des prélèvements stériles de 1ml à partir des Erlenmeyers contenant les cultures des souches tests et témoins sont effectués à des intervalles de temps réguliers (1h) afin d'évaluer la production de la biomasse bactérienne. Un volume d'1 ml d'HE est ajouté après 6 heures d'incubation (pendant la phase exponentielle) dans l'Erlenmeyer test afin de vérifier son activité antibactérienne. Les courbes de croissance des souches testées ont été tracées en fonction du temps. Elles présentent un comportement physiologique assez différent d'une manière que la phase exponentielle dure de 1-5 heures d'incubations chez *E. coli*, de 3-6 heures d'incubations chez *Proteus*, de 1-6 heures d'incubations chez *Staphylococcus aureus* (**Figure 32**) et 1-6 heures d'incubations chez *Pseudomonas aeruginosa* (**Figure 31**). Le suivi de la cinétique de croissance d'*E. coli*, *Proteus* et *Staphylococcus aureus* (**Figure 29, 30, 32**) a manifesté une diminution considérable de la biomasse bactérienne après l'ajout d'un volume de 1 ml d'huile essentielle de *Nigella sativa* après la 6 heures d'incubation. A l'opposé, une augmentation de la biomasse bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* a été observée après l'ajout de l'huile essentielle après 6 heures d'incubation.

Les résultats de la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de l'huile essentielle de *Nigella sativa* obtenus par le test d'aromatogramme, ainsi que les

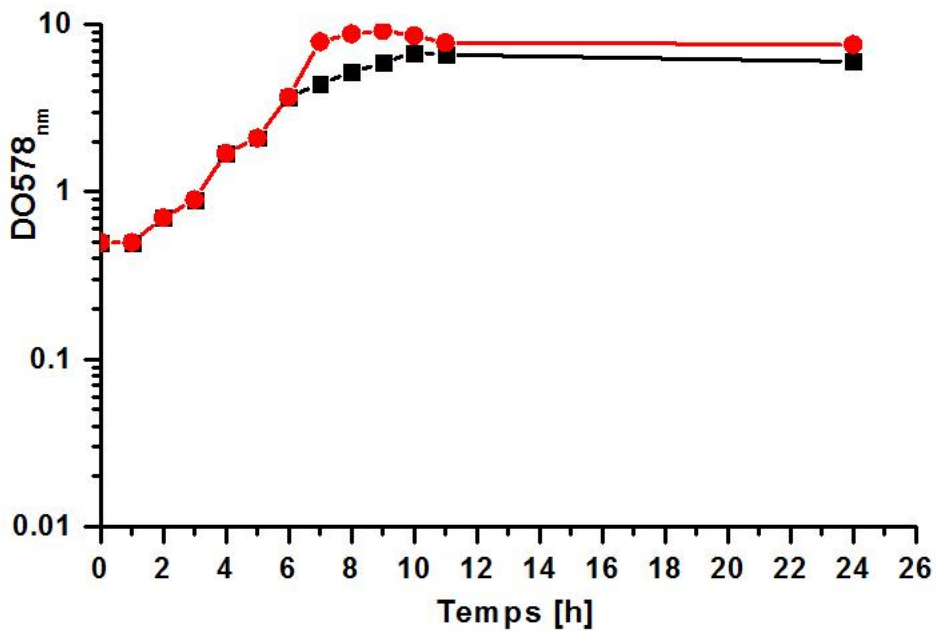
dilutions en milieu liquide s'opposent à ceux obtenus par le suivi de la cinétique de la croissance bactérienne en présence de l'huile essentielle. Dans le but de trouver une interprétation concrète sur l'augmentation de la biomasse bactérienne après l'ajout de l'huile essentielle, l'observation des cellules bactériennes de *Pseudomonas aeruginosa* traitée avec cette huile au microscope électronique reste indispensable.



**Figure 32:** La courbe du suivi de la cinétique de croissance d'*E. coli* sur un milieu de culture liquide de Seed, incubé à une température 30°C pendant 24 heures, en présence (—■) et en absence (—■) de l'huile essentielle de *Nigella sativa*.

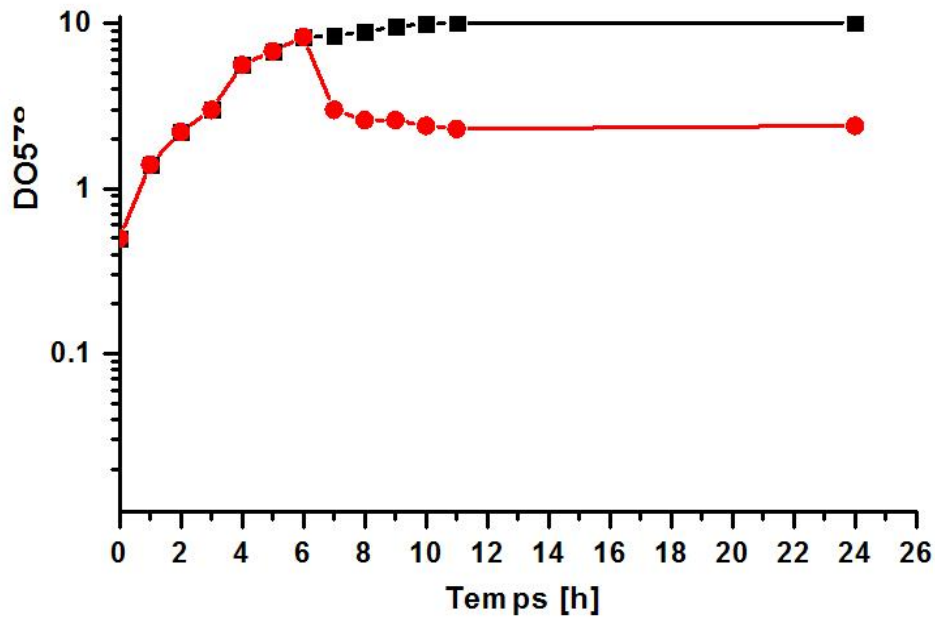


**Figure 33 :** La courbe du suivi de la cinétique de croissance de *Proteus* sur un milieu de culture liquide de Seed, incubé à une température 30°C pendant 24 heures, en présence (—●—) et en absence (—■—) de l’huile essentielle de *Nigella sativa*.

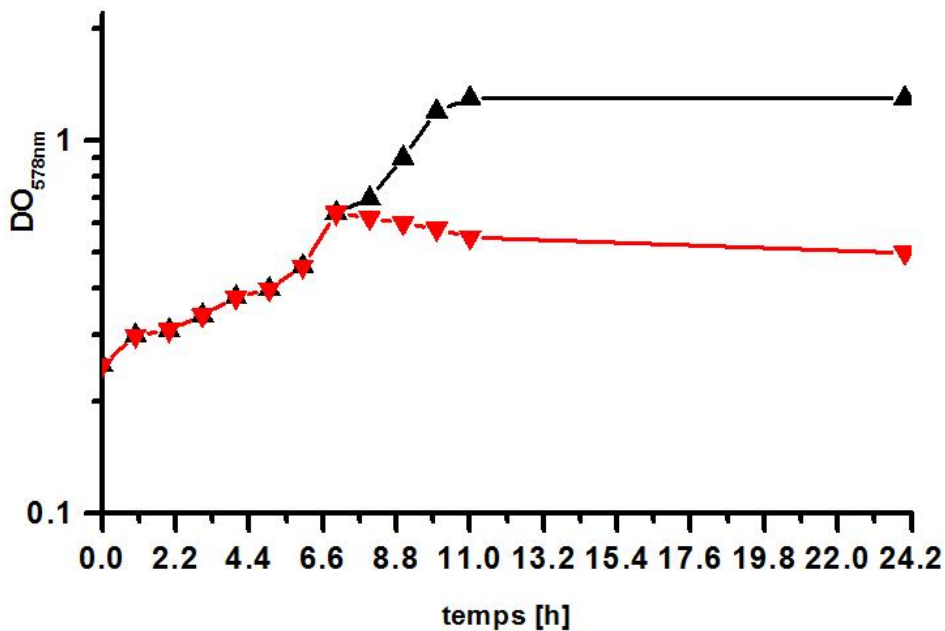


**Figure 34 :** La courbe du suivi de la cinétique de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur un milieu de culture liquide de Seed, incubé à une température 30°C pendant 24 heures, en présence (—●—) et en absence (—■—) de l’huile essentielle de *Nigella sativa*.

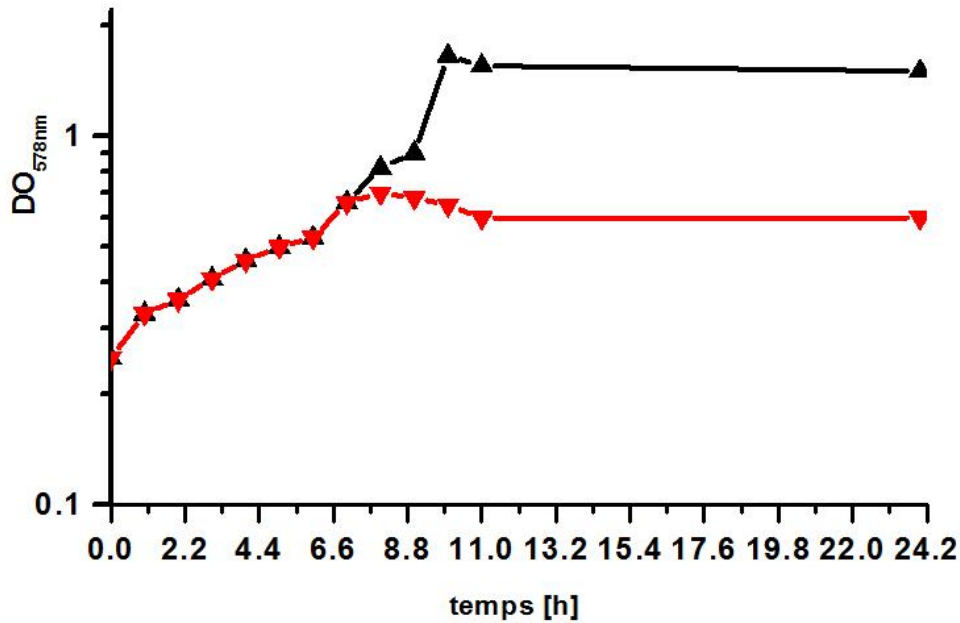




**Figure 35 :** La courbe du suivi de la cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* sur un milieu de culture liquide de Seed, incubé à une température 30°C pendant 24 heures, en présence (—●—) et en absence (—■—) des l’huile essentielle de *Nigella sativa*.



**Figure 36 :** Courbe de cinétique de croissance de *Bacillus cereus* sur milieu de culture Seed en en présence (—▲—) et en absence (—■—) des l’huile essentielle de *Nigella sativa*.



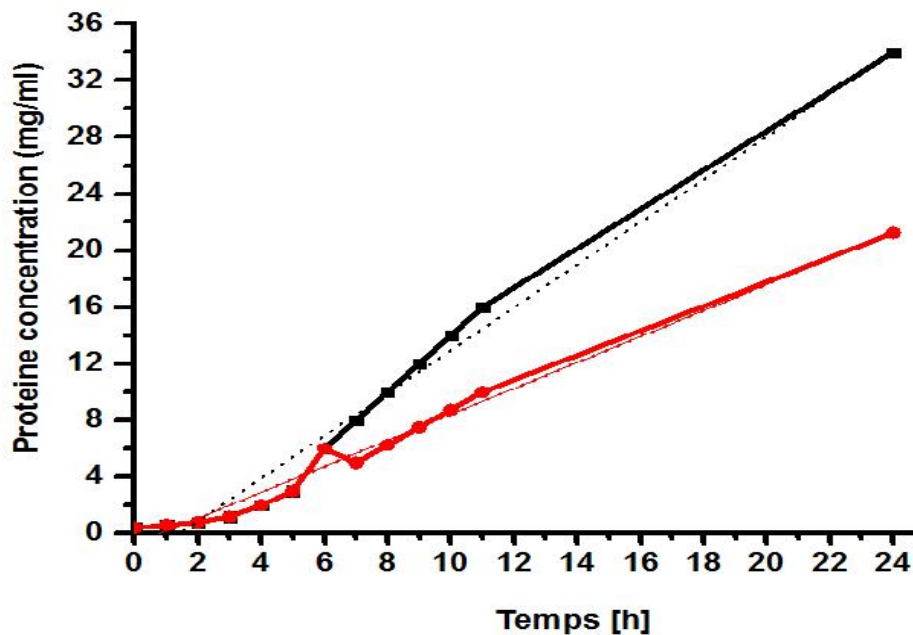
**Figure 37 :** Courbe de cinétique de croissance de *Bacillus cereus* sur milieu de culture Seed en présence (—▲—) et en absence (—▲—) de l'huile essentielle de *Nigella sativa*.

## 9. Etude de la synthèse des protéines de certaines souches en présence et en absence d'huile essentielle de *Nigella sativa*

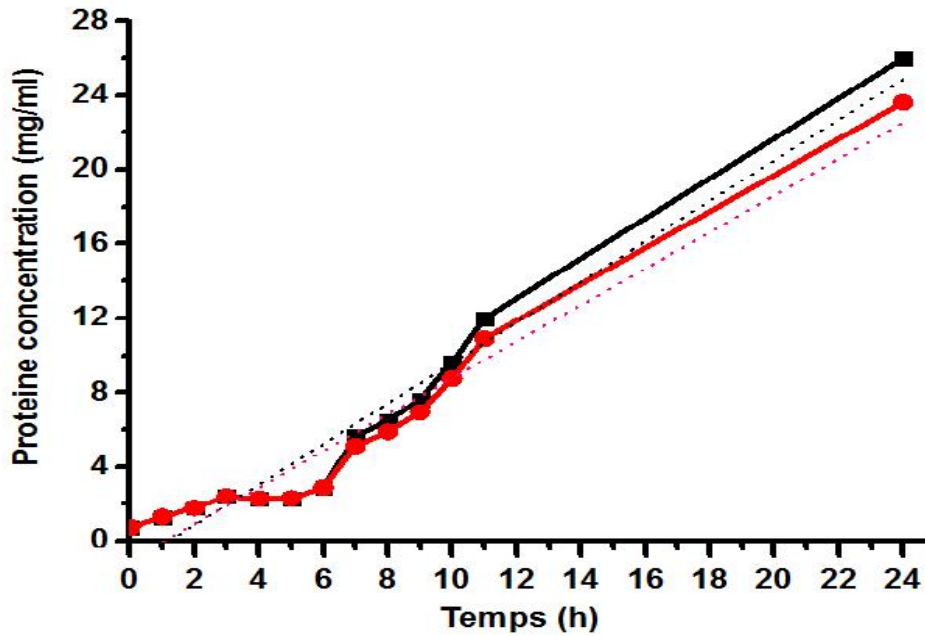
La détermination de la concentration des protéines synthétisées au cours des différentes phases de la croissance des différentes souches testées est effectuée sur un milieu de culture liquide par mesure de la densité optique du surnageant de la suspension bactérienne inoculée et incubée à une température de 37°C pendant 18- 24 heures, récupérée par centrifugation à une vitesse de 8000 rpm pendant 5 min, à deux longueurs d'ondes de 260, 280 nm respectivement.

L'étude du suivi de la synthèse protéique est réalisée sur les souches témoins de l'activité inhibitrice en présence et en absence des huiles essentielles extraites par hydrodistillation de *Nigella sativa*. Des prélèvements stériles de 1 ml à partir des Erlenmeyers contenant les cultures des souches tests et témoins sont effectués à des intervalles de temps réguliers (1h) afin d'évaluer la synthèse protéique. Un volume d'1 ml d'HE est ajouté après 6 heures d'incubation.

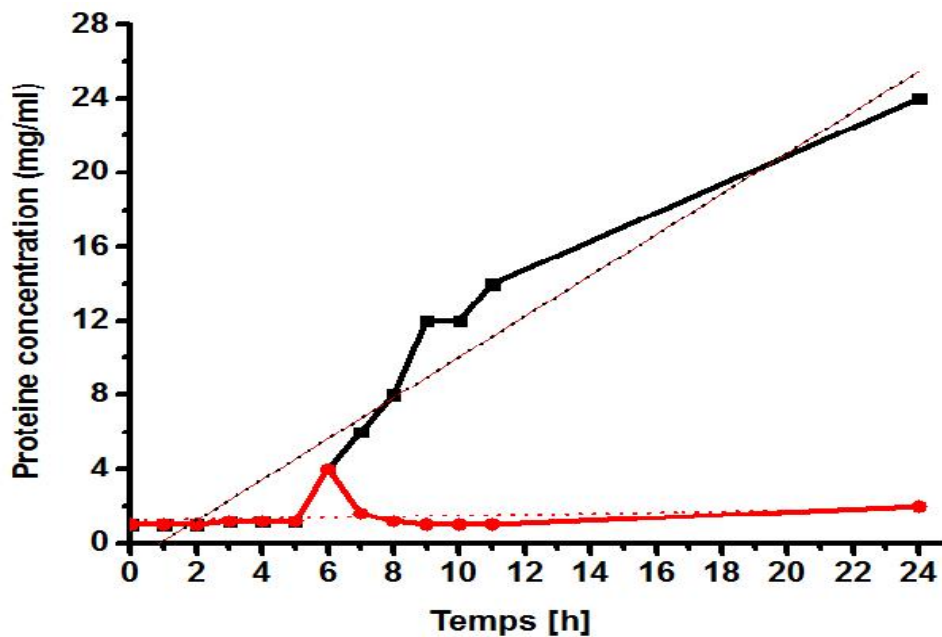
Le suivi de la synthèse protéique chez *Enterobacter*, *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* (**Figure 37, 38, 39**) a manifesté une diminution considérable de la concentration des protéines synthétisées après l'ajout d'un volume de 1 ml d'huile essentielle de *Nigella sativa* après la 6<sup>ème</sup> heure d'incubation. Cependant, l'ajout de l'huile essentielle de la Nigelle à la culture d'*E. coli* (**Figure 35**), a manifesté une diminution moyenne de la concentration des protéines synthétisées. Par ailleurs, une faible réduction de la concentration des protéines synthétisées chez *Pseudomonas aeruginosa* (**Figure 36**) est observée après l'ajout de l'huile essentielle après 6 heures d'incubation. Dans le but d'explorer une interprétation concrète sur la réduction de la concentration de la concentration des protéines synthétisées chez les souches testées après l'ajout de l'huile essentielle de la Nigelle, l'observation des cellules bactériennes traitées au microscope électronique reste indispensable.



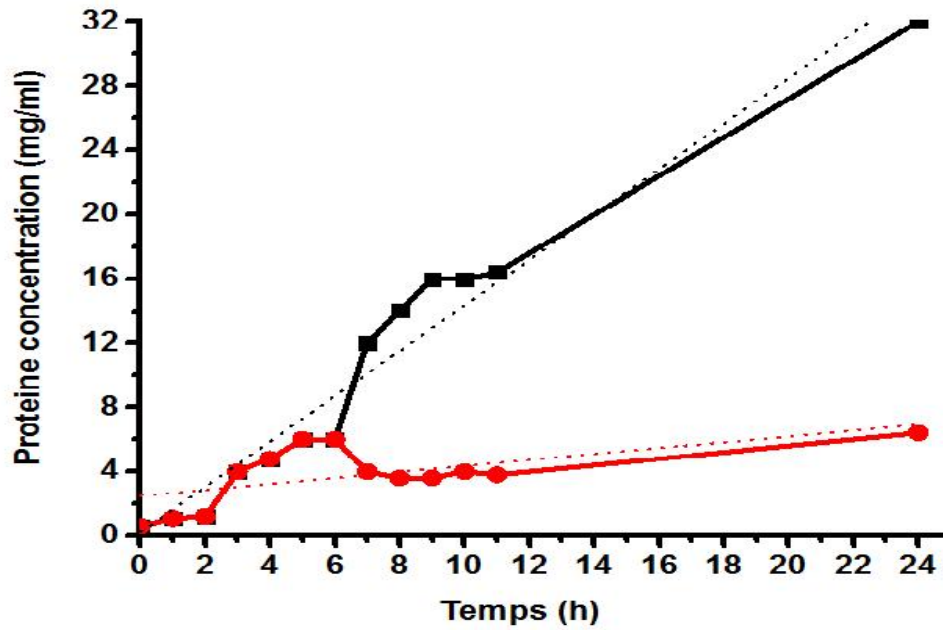
**Figure 38** : Etude du suivi de la synthèse des protéines chez *E. coli* sur milieu de culture Seed en présence (—) et en absence (—) des huiles essentielles de *Nigella sativa*.



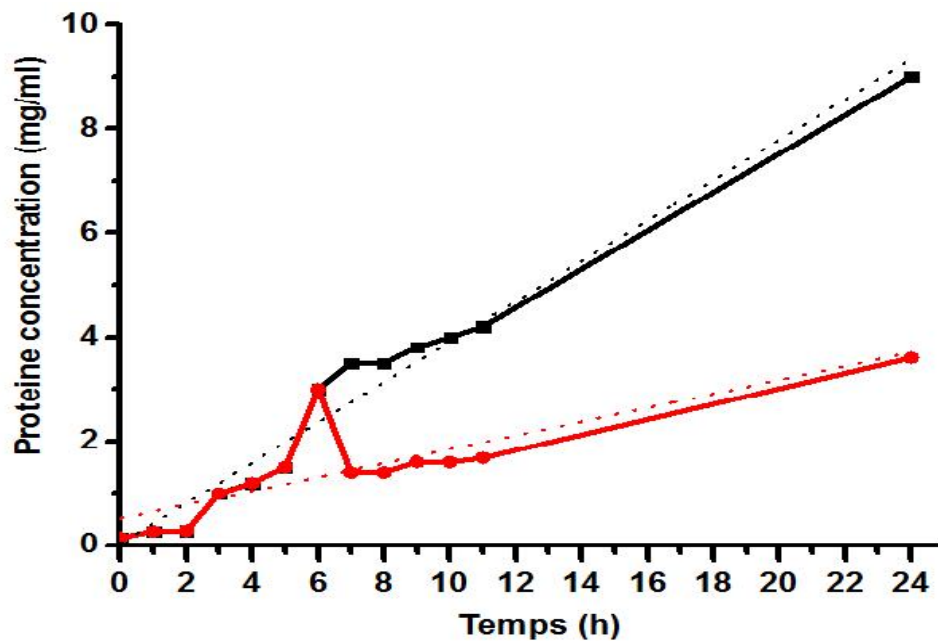
**Figure 39 :** Etude du suivi de la synthèse des protéines chez *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu de culture Seed en présence (—■) et en absence (—●) des huiles essentielles de *Nigella sativa*.



**Figure 40 :** Etude du suivi de la synthèse des protéines chez *Enterobacter* sur milieu de culture Seed en présence (—■) et en absence (—●) des huiles essentielles de *Nigella sativa*.



**Figure 41 :** Etude du suivi de la synthèse des protéines chez *Staphylococcus aureus* sur milieu de culture Seed en présence (—) et en absence (—) des huiles essentielles de *Nigella sativa*.



**Figure 42 :** Etude du suivi de la synthèse des protéines chez *Bacillus cereus* sur milieu de culture Seed en présence (—) et en absence (—) des huiles essentielles de *Nigella sativa*.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La validation de l'usage des drogues végétales comme remède traditionnel dans le traitement des maladies devrait passer par l'évaluation de leur efficacité, de leur innocuité et la standardisation de leur emploi afin de constituer un moyen complémentaire dans le système de soin conventionnel. Cette étude est portée sur deux produits cosmétiques à vocation médicamenteuse et à base d'huile essentielle de nigelle (*Nigella sativa*).

L'étude de la qualité graine de nigelle est évaluée par la mesure du taux d'humidité, de la matière sèche, de la matière organique et minérale. Les résultats obtenus de la caractérisation chimique des graines de la nigelle, réalisée par la méthode de réaction colorée ont montré la présence des saponosides, des flavonoïdes et des alcaloïdes.

L'extraction des huiles essentielles à partir des produits cosmétiques est réalisée par la méthode d'hydrodistillation. Le rendement en huile essentielle est acceptable en comparaison avec les résultats retrouvés dans plusieurs publications.

L'étude des caractéristiques physicochimiques, évaluées par la mesure d'un certain nombre d'indices tels que la densité, le pouvoir rotatoire, l'indice de réfraction et la miscibilité à l'éthanol se concordent avec d'autres travaux publiés par auteurs avec de légères différences. La détermination des caractères organoleptiques des huiles essentielles dépendent principalement de trois critères l'aspect, la couleur et l'odeur qui sont d'ailleurs typiques à cette plante. La caractérisation des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée avec une détection par spectrométrie de masse a permis l'identification, l'évaluation des constituants et la recherche d'éventuelles falsifications.

L'exploration de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de la nigelle vis-à-vis d'une large gamme de microorganismes, la détermination de la CMI, CMB, CMF et la cinétique de croissance bactérienne est réalisée par l'utilisation des méthodes standardisées. Les résultats obtenus ont montré que les HE de la nigelle ont manifesté une activité inhibitrice particulière sur la croissance d'une large classe de microorganismes. En outre, l'activité antibactérienne des huiles essentielles est considérablement influencé par la nature et la proportion des constituants qui entrent dans sa composition de la graine de la Nigelle.

Les huiles essentielles de la nigelle ont révélé une importante inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, traduite par la formation d'un diamètre d'une zone inhibition de (32 mm). Cependant, cette souche présente une importante résistance vis-à-nombreux antibiotiques (tétracycline, gentamycine, konamycine etc....). Par ailleurs, l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la nigelle vis-à-vis de certaines souches bactériennes à Gram négatif (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, et *Enterobacter*) a montré une moyenne inhibition de la croissance de ces souches testées, traduite par la formation d'un diamètre d'une zone d'inhibition de entre 13-15 mm.

L'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles de la nigelle vis-à-vis *C. albicans*, a montré *Rhodotorula* a manifesté une faible inhibition. La variabilité de la sensibilité des microorganismes à l'action des huiles essentielles, serait liée directement à la nature chimique de ses composants majoritaires ou même aux composants minoritaires. L'étude du suivi de la cinétique de croissance bactérienne en présence et en absence des huiles essentielles constitue un outil supplémentaire pour l'étude de l'activité antibactérienne.

En perspectives, des expériences supplémentaires telles que l'étude synergétique par combinaison des huiles essentielles extraites à partir de différentes plantes médicinales devraient être réalisées. Ensuite, une caractérisation des molécules responsables des activités antibactériennes et antifongiques est envisagée. Identification et expression des gènes impliqués dans la production des molécules responsables des activités antibactériennes.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**



## Références Bibliographiques

**Abdel-Fattah F.M., Matsumoto K., Watanabe H et al. (2000).** Antinociceptive d'huile de *Nigella sativa* et son composant principal, thymoquinone chez les souris. EUR J. Pharmacol 400 : 89-97.

**Abdesselam Z. (2006).** Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré Nutra News., pp. 6-16

**Agrawal R., Kharya M.D and Shrivastava R (1979).** Antimicrobial and antihelminthic activities of the essential oil of *Nigella sativa* L. Indian J. Exp. Biol. 17 : 1264-1265.

**Aggarwal B. B., Kunnumakkara A. B. (2009).** *Molecula Therapeutic Uses of Spices, Modern Uses for Ancient Medicine.* Singapore: World Scientific Publishing

**Ahmed O., Abdel-Zaher., Mahran S., Abdel-Rahman., Fahmy M., ELwasei,** *Protective effect of Nigella sativa oil against tramadol-induced tolerance and dependence in mice: Role of nitric oxide and oxidative; stress NeuroToxicology*, 32, 725-733.

**Aksoy A., Türkay S., Tuter T., Ustun G., Riva S., Secundo F. (2001).** investigation of substrate selectivity of *Nigella sativa* seed lipase(s). Joint research project (1999-2001). CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche). *Italy and Tubitak* (Turkish Scientific and Technical Research Center), Turkey

**Akram Khan M. (1999).** Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* Linn. *Inflammopharmacology* , 7 (1), 15-35.

**Alam M. M., Yasmin J., Nessa C. R., Ahsan Al jassir M. (1992).** Antibacterial activity of chloroform and ethanol extracts of black cumin seeds (*Nigella sativa*) against multi-drug resistant human pathogens under laboratory conditions. Department of Microbiology, University of Dhaka, Dhaka 1000, Bangladesh. Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa*) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry* (45), 239-242.

**Ali B., BLUNDEN G. (2002).** Pharmacological and Toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res* , 15, 59-69.

- Al-Saleh I. A., Billedo G., El-Doush I. (2006).** Levels of selenium, DL- $\alpha$ -tocopherol, DL- $\gamma$ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: 167-175.
- Atta M. B. (2003).** Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*, **83**: 63–68.
- Babar A., Hahn E.J., Paek K.Y. (2007).** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*. **12**: 607-621.
- Babayan V., Kootungal D., HAlaby G. (1978).** Proximate analysis, Fatty acid and amino acid composition of *Nigella sativa* seeds. *Food Sciences* (43), 1314-1315.
- Babayi H., Kolo I., Okogum J. I. (2004).** The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogen microorganisms. *Biochemisten*: 16(2):102- 105
- Bachelot C., Blaise A., Corbel T., Guenic A. (2006).** Les huiles essentielles. Travail d'étude semestre(1) licence de biologie Bretagne nord. 5-9.
- Baser K. H. C., Buchbauer G. (2010).** Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.
- 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: 2-9.
- Belaiche P. (1979).** "L'aromatogramme". *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. M.S.A Editeur. Paris.
- Bendahou M. (2007).** Composition chimique et propriétés biologiques des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales de l'Ouest algérien. Thèse de doctorat d'état, univ, Tlemcen faculté des sciences.
- Benkaci A., Baaliouamer F., Meklati A. (2006).** By kinetic study of microwave extraction of essential oil *Nigella sativa* L seeds chromatographic. (64): 227-231.
- Benyoussef E. H., Zouagh N., Belabbes R., Bessiere J. M. (2001).** Botanical study of algerian *Nigella* seeds and analysis of their essential oil. *Rivista italiana EPPOS* : 31 15-19.

- Birt D. F., Hendrich S., Wang W. (2001).** Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90, (2-3), 157-177.
- Boyd B., Ford C., Gary K. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé *Glycoscience & Nutrition* 4(6)7.
- Bruneton J. (1999).** "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Techniques et Documentations, 3<sup>ème</sup> Editions médicales internationales. Lavoisier.
- Bruneton J. (2005).** *Plantes toxiques - Végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux*, 3<sup>e</sup> éd., revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, 630 . ISBN 2-7430-0806.
- Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales, 4<sup>ème</sup> édition. Paris: Tec & Doc (Editions).
- Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 2<sup>e</sup> Edt. Tech.& Doc, Lavoisier, Paris.
- Burits M., Bucar F. (2000).** Antioxydant activity of *Nigella sativa* L. essential oil. *Phytother Res* , 14 (5), 323-328.
- Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223-253
- Caillet S., Lacroix M. (2006).** INRS-Institut Armand Frappier.
- Caillet S., Lacroix M. (2007).** Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS - Institut Armand - Frappier, Université de Laval (Québec).
- Cavallo J. D., Chardon H., Chidiac C., Choutet P., Courvalin P., Debernat H., Drugeon H., Dubreuil L., Goldstein F.W., Jarlier V., Lecleco R., Nicolas-Chanoine M. H., Phillipon A., Quentin C., Rouveux B., Sirot J., Soussy C. J., (2007).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.1-23.
- Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K. H. C. (2007).** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, 100: 553-559.

- Charrouf Z., Guillaume D. (2007).** Phenols and polyphenols from *Argania spinosa*. *American Journal of Food Technology*. (2), 679-683.
- Chatterjee A. (2004).** Inhibition of *Helicobacter pylori* ; in-vitro by various berry extracts with enhanced susceptibility of clarithromycine. *Mol. Cell. Biochem.*, 265(1-2) : 19-26.
- Cheikh-Rouhou S., Besbes S., Hentati B., Blecker C., Deroanne C., Attia H. (2007).** *Nigella sativa L.* Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*. 101 : 673-681.
- Cihan T. (2012).** A propos de *Nigella sativa L.* Thèse de doctorat Université de Lorraine, France.
- Cox S. D., Markham J. L. (2007).** « Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 103, (4): 930-936.
- Cristiani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M. G., Micieli D. (2007).** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6300-6308.
- Dacosta Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. *Ed Yves Dacosta. Paris*. 317 p
- Dantuono L. F., Moretti A., Lovato A. F. S. (2002).** Seeds yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa L.* and *Nigella damascena L.* *Industrial Crops and Products* : 15 59-69
- David M. D., Kearns A. M., Gossain S., Ganner M., Holmes A. (2006).** Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : nosocomial transmission in a neonatal unit. *The Journal of Hospital Infection*, 64(3), 244-250. doi : 10.1016/j.jhin.2006.06.022.
- De Lucca A.J., Cleveland T. E., Wedge D. E. (2005).** Plant-derived antifungal proteins and peptides. *Can. J. Microbiol.* Vol. 51. NRC Research .Canada.
- De Biller Beck V. G. (2002).** Essais d'utilisation d'huiles essentielles en traitement de l'air, les contaminants biologiques des biens culturels Muséum National d'histoire Naturelle et Ed scientifiques et médicinales Elsevier. 345-358.

- Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D., Mauriello G., (2007).** « Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils », *J. Agric. Food Chem.*, 55, (12). 4863-4870.
- El-Abhar D. M., Saleh A. S. (2003).** *Gastroprotective activity of Nigella sativa oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats* ; *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 84, Issues 2–3, February, Pages 251-258 H.S.
- El-Dakhahny M., Madi N. J., Lembert N., Ammon H. P. T (2002).** *Nigella Saliva* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-Lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 2, 161-164.
- El-Kamali H., Ahmad H., Mahammad A., Yahia A., El-Tayeb A., Ali A. (1998).** Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds. 69, 77-78.
- El-Obeid A., Al-Harbi S., Al-Jomah N., Hassib A. (2006).** Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF- ), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine*. (13) : 324-333.
- EL-Tahir K. E. H., AL-Ajmi M. F., AL-Bekairi A.M. (2003).** Some cardiovascular effects of the dethymoquinonated *Nigella sativa* volatile oil and its major components -pinene and p-cymene in rats. *Saudi Pharm.J.* : (11):104-110.
- Fabienne O. (2005).** *La nigelle, une épice d'intérêt médicinal*, Thèse, Faculté de pharmacie de Grenoble., 174 p.
- 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 .*C. R. Biologies*. 331: 372-379.
- Ferdous A., Islam S., Ahsan M., Hasan C., Ahmad Z. (1992).** In vitro antibacterial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds against multiple drug-resistant isolates of *Shigella* species and isolates of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Phytother Res* , 6 (2) 137-140.
- Ferhat M. A., Meklati B. Y., Chemat F. (2010).** *Citrus d'Algérie: les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions* .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157 p.

- Garnier M., Delamare V., Delamare J., Delamare J., Delamare T. (2009).** Dictionnaire illustré des termes de Médecine 30 ème édition. Paris: Maloine.
- Gee J. M., Johnson I. T. (2001).** Polyphenolic compounds : interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. 8 : 1-182.
- Ghedira K. (2006).** La Nigelle cultivée *Nigella sativa* L (Renunculaceae). Laboratoire de pharmacognosie faculté de pharmacie de Monastir Tunisie. *Phytothérapie* (4)1-7. 220-226.
- Gibbons. S. (2008).** Phytochemicals for bacterial resistance strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.*74: 594-602
- Gilani A.H., Jabeen Q., Khan M. A. U. (2004).** A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan journal of biological sciences*. 7 : 441-451.
- Gomez-Caravaca A. M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.
- Gonny M, Bradesi P., Casanova J. (2004).** Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Flavour Fragr. J.* 19: 424-433.
- Goreja W.G. (2003).** Black Seed Nature's Miracle Remedy, Amazing Herbs Press,.
- Goto M., Honda K., Di L., Small D.M. (1995).** Crystal structure of a mixed chain diacylglycerol, stearyl-3-oleyl-glycerol. *Journal of lipid research*, (36) 2185-2190.
- Greenish, H, (1880).** *Contribution to the Chemistry of Nigella sativa* (Vol. 10). *Pharmac J. Trans*.
- Guenther E. (1972).** Analyse de l'huile essentielle d'*ammoïdes verticullata* (Nûnkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien, Mémoire de Magistère en biologie moléculaire et cellulaire, universitaire de Tlemcen (UT),(2002).
- Guignard J. L. (2001).** Abrégés de botanique systématique moléculaire. Masson, Paris.
- Gwendolyn L. (2007).** (ed.), *The Babylonian world*, Routledge.

- Hajhashemi V. A., Ghannadi H., Jafar A. (2004).** Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. *Phytotherapy Research*. 18, 3, 195-199.
- Hale A. L (2003).** Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds. Office of graduate studies of Texas A & M university. Genetics.
- Hammes W.P., Hertel C. (2006).** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap.1.2.10. In prokaryotes. 4: 320-403.
- Hanafy M.S., Hatem M.F. (1991).** Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed ( Black cumin). *J. Ethnopharmacol* 34(2-3), pp. 275-278.
- Harborne J. B., Williams C. A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55, (6), 481-504.
- Hashim E. M., El-Kiey M. A (1962).** *Nigella sativa* seeds of Egypt, Egypt. *J. Pharmacy. Sci. United Arab Rep.* 3: 121-133.
- Havsteen B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, (2-3), 67-202.
- Hegi, G. (1975).** *Illustrierte Flora von Mitteleuropa* (éd. 2nd edn., Vol. III). Berlin: Parey.
- Hilali M. (2008).** Contribution à la valorisation de l'arganier (*Argania spinosa* (L.) sapotaceae): Etude de la composition chimique de l'huile d'argane en fonction de son mode d'extraction et de son origine de production. Analyse multicritère pour la recherche d'adultération de l'huile d'argane. Etude des composés phénoliques de la pulpe du fruit de l'arganier. *Thèse de Doctorat National, Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal*
- Houghton P., Zarka R., De Las Heras B., Hout J. (1995).** Fixed oil of *Nigella sativa* and eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation derived thymoquinone inhibit. *Planta medica* (61), 33-36.
- Kanko C., Sawaliho B. E., Kone S. Koukoua G., N'guessan Y. T. (2004).** « Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ». *Comptes rendus Chimie* 7 (1039–1042).

- Karamali K., Teunis V. R. (2001).** « Tannins : classification and definition », *Nat. Prod. Rep.*, vol. 18.
- Khan A. (1993).** CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitothérapie* 64(5) : 407-410.
- Khan M. (1999).** Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* Linn. *Inflammopharmacology* , 7 (1), 15-35.
- Klaric M. S., Kosalec I., Mastelic J., Pieckova E., Pepeljnak S. (2006).** Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*, **44** (1) : 36-42
- Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y. A., Millet J et Chaumont J. P. (2004).** Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 148, 202-206.
- Kon K.V., Rai M. K. (2012).** Plant essential oils and their constituents in coping with multidrugresistant bacteria. *Expert Rev. Anti infect. Ther* 10, 775-790.
- Kremers E., WAakema N., Hixon R. (1941).** *Thymoquinone* (Vol. 1).Organic Syntheses.
- Kumara S. S., Huat B. T. (2001).** Extraction, isolation and characterization of antitumor principle, alphahederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta Medica*, **67**: 29-32.
- Kunle O., Okogun J., Egamana E and Shok M. (2003).** "Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract" *Phytomedicine*. 10, 59-61.
- Labhel A., Settaf A., Hassar M., Slaoui A. (2009).** Propriétés antidiabétiques des graines de *Nigella sativa* chez le mériones shawi obese et diabétique. *Espérance Médicale*. 47: 72-74.
- Lagunez R. (2006).** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé paaaar induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat d'état université de Toulouse.
- Lamy S., Gingras D., Beliveau R. (2002).** «Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation». *Cancer Res*. vol. (62)381-385.



- Lapraz J. C., Duraffourd C. (2002).** Traité de phytothérapie clinique. Masson Paris.
- Leitao D. P., Polizello A. C., Ito I.Y., Spadaro A. C. (2005).** Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J Med Food*: 8(1):36.
- Le minor L., Veron M. (1989).** Bactériologie médicale. 2ème édition. Ed. Flammarion. Paris.
- Lhuillier A. (2007).** Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Toulouse.
- Lis-balchin M. (2002).** « Geranium and pelargonium: the genera *Geranium* and *Pelargonium* ». CRC Press, Taylor & Francis, London.
- Lock O., Cabello I., Doroteo V. H. (2006).** Analysis of flavonoids in plants. *Current Medicinal Chemistry*.**20** : 6-11.
- Lucchesi A. M. E. (2005).** « Extraction sans solvant assistée par microondes : Conception et application à l'extraction des huiles essentielles ». Thèse de Doctorat en sciences (option : Chimie), Faculté des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, juillet.
- Mahfouz M., El-Dakhkhny M. (1960).** Chemical and pharmacological properties of the new antiasthmatic drug, nigellone. *Egyptian Pharmaceutical Bulletin*(42), 411-424.
- Mahmoud N. (2002).** The effect of *Negella sativa* oil against the liver damage induced by shistosoma mansoni infection in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 79(1) : 1-11.
- Malecky M. (2007).** Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).Paris.
- Mamatha B. (2005).** Screening of medicinals plants used in Rural Indian Folk medicine for treatment of diarrhea.
- .Martin G., Duez H., Blanquart C.V. B., Poulain P., Fruchart J. (2001).** Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest* (107), 1423-1432.

- Martin S., Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. **51**: 304-315.
- Marzouk B., Marzouk Z., Décor R. (2009).** Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. Tunisia. *Journal of Ethnopharmacology* 125(2009) 344-349. Elsevier.
- McCalley D.V. (2002).** Analysis of the *Cinchona* alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques, Review. *Journal of Chromatography A*, **967**, 1-19
- Mohamed A., Toama Taha S., El-alfy, Hamed M. E. (1974).** Antimicrobial Activity of the Volatile Oil of *Nigella sativa* Linnaeus Seeds Faculty of Pharmacy, Cairo University, Egypt.
- Morsi N. (2000).** Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiol Pol* , 49 (1), 63-74.
- Muhammad T. S., Masood S. B., Faqir M. A., Amer J., Saeed A., Muhammad N. (2009).** National Institute of Food Science and Technology, University of Agriculture. Faisalabad, Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 41(3): 1321-1330.
- Mukherjee P.K., Maiti K., Mukherjee K., Houghton P.J. (2006).** Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *J. of Ethnopharmacol*: 106: 1-28.
- Narashima Rao B.G.V., Subba R. (1972).** The efficacy of some essential oils on pathogenic fungi. II. The flavor industry. 3: 368-370.
- Nergiz C., Otles S. (2003).** Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*, **83**: 63-68.
- Ngakegni-Limbili A. C. (2012).** Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserves et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale ; These de Toulouse.doctorat ,INP.
- Okigbo R.N., Mbajinka C.S., Njoku C. O. (2005).** antimicrobial potentials of (*UDA*) *xylopia aethopica* and *Occinum gratissimum* L. some pathogenous of man.
- Olle M., Bender I. (2010).** The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research* 8 (3) 687-696.

- Ouraini D., Agoumi, A., Ismaïli-Alaoui M., Alaoui, K. (2005).** Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*. N°4: 147-157.
- Pauli A., Schilcher H. (2010).** In Vitro Antimicrobial Activities of Essential Oils Monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition, In , In Baser K.H.C. et Buchbauer G. *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. (353-548).
- Peter K. V. (2004).** *Handbook of herbs and spices* (Vol. 2). Cambridge: Wood head Publishing in Food Science and Technology.
- Pibiri M. C. (2005).** «Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles » ; Thèse de doctorat ès sciences, école polytechnique fédérale de Lausanne.
- Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C., Roura S. I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*, **36**, 679-684.
- Price L., Price, S. (2004).** Understanding hydrolats: The specific hydrosols for aromatherapy. Churchill Livingstone. 294 p.
- Ramadan M. F., Morsel J.T. (2002).** Neutral lipid classes of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Eur. Food Res. Technol.* 214 202-206
- Rasooli I., Rezaei M. B., Allameh A. (2006).** Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infect. Dis.* **10**: 236-241
- Rathee P. S., Mishra S. H., Kaushal R. (1982).** Antimicrobial activity of essential oil, fixed oil and unsaponified matter of *Nigella sativa* L. *Indian J. Pharmac.* 1982 : 44 8-10.
- Razakarivony A. A., Andriamihaja B., Razanamahefa B. (2009).** Etude chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Callistemon rigidium*. Actes du symposium biomad. Université d'Antananarivo. 28p
- Rivera A., Giono S., Gonzalez M., Rodríguez N., Cedillo L. (2011).** "Antibacterial effect of *Morinda citrifolia* fruit juice against mycoplasmas." *Annals of Biological Research* 2: 491-497.

- Sagdiç Ö. (2003).** Sensitivity of four pathogenic bacteria to turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm-Wiss Technol.* 36,467-473.
- Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Prevost H. et Kihal M. (2002).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides.* 1: 1-11.
- Seyoum A., Asres K., El-Fiky E. K. (2006).** Structure radical scavenging activity relationships of flavonoïds. *Journal of photochemistry.* 67 : 205-207.
- Sivakumaran S., Molan A. L., Meagher L. P., Kolb B. (2004).** Variation in antimicrobial action of pranthocyanidins from *Dorycrum rectum* against rumen bacteria. *Phys Chem:* 5(3):106-111
- Sokmen A., Jones B., Erturk M. (1999).** The in vitro antibacterial activityof Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol* , 67, 79-86.
- Soumyanath A. (2006).** Traditional Herbal Medicines for Modern Times: Antidiabetic plants. CRCPress (Taylor Francis Group); 6: 19-82.
- Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt,D., (2002).** High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups *Review Journal of Chromatography A*, 967, 85-113.
- Sunan W., Kelly A. M., Massimo F. M., Yukio K., Rong T. (2011).** *Synergistic, Additive, and Antagonistic Effects of Food Mixtures on Total Antioxidant Capacities.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (59) 960-968.
- Surh Y. J. (2003).** «Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals». *Nat. Rev. Cancer.* vol. 3, (10) 768-780.
- Takruri H. R. H., Dameh M. A. F. (1998).** Study of the nutritional value of black cummin seeds (*Nigella sativa* L.). *J.Sci.Food Agric.* 76 404-410.
- Taskin M. K., Alankus Caliskan O., Anil H., Abou-gazar H., Khan A. I., Bedir E. (2005).** Triterpène saponins from *Nigella sativa* L. *Turkish Journal of Chemistry.* 29 : 561-569.
- Tegos G., Stermitz F. R., Lomovskaya O., Lewis K. (2002).** *Antimicrob. Agents Chemother.*46: 3133-3141.

- Tissera P. (1998).** Département of dravya GUNA and Rosa sâstra. Institute of indigenous medicine university of Colombo, Rajagipiya Srilankan.
- Twidwell E.K., Wagner J.J., Thiex N. (2002).** Use a microwave oven to determine moisture content of forages.
- Ulanowska K. (2006).** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. Arch. Microbial. 184 (5): 271-8.
- Ultee A., Smid E. J. (2002).** Influence of carvacrol on growth and toxin production by *bacillus cereus*. International journal of Food Microbiology. 68, 1561-1568.
- Vansant G. (2004).** Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium «antioxydants et alimentation». Institut Danone.
- Vila R., Mundina M., Tomi F., FurSan R., Zacchino S., Casanova J., Canigüeral S. (2002).** Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. Planta med. 68, 164-167.
- Viljoen A. Van Vuuren S., Ernst E., Klepser M., Demirci B., Baser H., Van Wyk B. E. (2003).** *Osmitopsis asteriscoides (Asteraceae)*-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *J. Ethnopharmacol.* **88**: 137-143
- Weiss E. A. (2002).** *Spices Crops*. Wallingford: CABI Publishing.
- Wichtl M., Anton R. (2003).** Plantes thérapeutiques Tec et Doc. Lavoisier EMI Paris.
- Zaghlol D., Kamel E., Mohammed D., Abbas N. (2012).** The possible toxic effect of different doses of *Nigella sativa* oil on the histological structure of the liver and renal cortex of adult male albino rats. *Egypt J Histol.*, 35 (1), 127-136.
- Zaoui A. (2000).** Effets diurétiques et hypotenseurs de *Nigella sativa* chez le rat spontanément hypertendu. *Thérapie* 55.
- Zaoui A., Cherrah Y., Mahassine N. (2002).** Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *Journal of Ethnopharmacology* 79. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine*. 9 : 69-74.

# ANNEXES

# Annexes

## ANNEXE 1

Composition de l'H.E des graines de *Nigella sativa*  
(Aboutabl *et al.*, 1985).

N° du pic	composants	pourcentage
1	<b><math>\alpha</math>-pinène</b>	<b>9,30</b>
2	camphène	0,06
3	hexanal	0,07
4	b-pinène	2,20
5	sabinène	0,76
6	myrcène	0,05
7	$\alpha$ -terpinène	0,06
8	limonène	1,60
9	$\beta$ -phéllandrène	0,01
10	1,8-cinéole	0,08
11	ester éthylique de l'acide hexanoïque	0,01
12	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -S-S-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	<0,01
13	g-terpinène	0,51
14	<b>p-cymène</b>	<b>31,70</b>
15	terpinolène	0,06
16	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -S-S-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> I	0,05
17	2-hepténal	0,13
18	ester éthylique de l'acide heptanoïque	0,01
19	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> -S-S-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,05
20	artémisia cétone	0,14
21	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> -S-S- C <sub>3</sub> H I	0,13
22	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> -S-S- C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> I	0,01
23	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -S-S- C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> II	0,01
24	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> -S-S- C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> II	0,08
25	ester éthylique de l'acide octanoïque	0,07
26	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> -S-S- C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> II	0,17
27	$\beta$ -thujone	0,01
28	trans-hydrate sabinène	0,07
29	longipinène	0,18
30	camphre	0,06
31	ester éthylique de l'acide nonanoïque	<0,01
32	linalol	0,06
33	cis-hydrate sabinène	0,01
34	longifolène	0,78
35	acétate de bornyl	

## Annexes

---

36	2-undécanone	0,05
37	4-terpinéol	0,58
38	ester éthylique de l'acide décanoïque	<0,01
39	2-dodécenal	<0,01
40	1,8-p-menthadiène-4-ol	<0,01
41	carvotanacétone	0,01
42	bornéol	<0,01
43	carvone	0,19
44	<b>thymoquinone</b>	<b>24,50</b>
45	2-tridécane	0,01
46	trans-anéthole	0,05
47	ester éthylique de l'acide dodécanoïque	<0,01
48	p-cymène-8-ol	0,13
49	p-anisaldéhyde	<0,01
50	ester éthylique de l'acide tétradécanoïque	0,22
51	4-hydroxy-4-méthyl-2-cyclohexénone	0,01
52	ester éthylique de l'acide pentadécanoïque	0,01
53	thymol	0,01
54	carvacrol	1,10
55	ester méthylique de l'acide hexadécanoïque	0,08
56	ester éthylique de l'acide hexadécanoïque	2,80
57	ester éthylique de l'acide hexadécénoïque	0,09
58	ester éthylique de l'acide heptadécanoïque	<0,01
59	ester méthylique de l'acide octadécanoïque	<0,01
60	ester méthylique de l'acide oléique	0,05
61	ester éthylique de l'acide octadécanoïque	0,21
62	ester éthylique de l'acide oléique	2,70
63	ester méthylique de l'acide linoléique	0,20
64	ester éthylique de l'acide linoléique	9,40
65	ester éthylique de l'acide linoléique	0,05
66	acide hexadécanoïque	0,15
67	thymohydroquinone	0,6

---



## Annexes

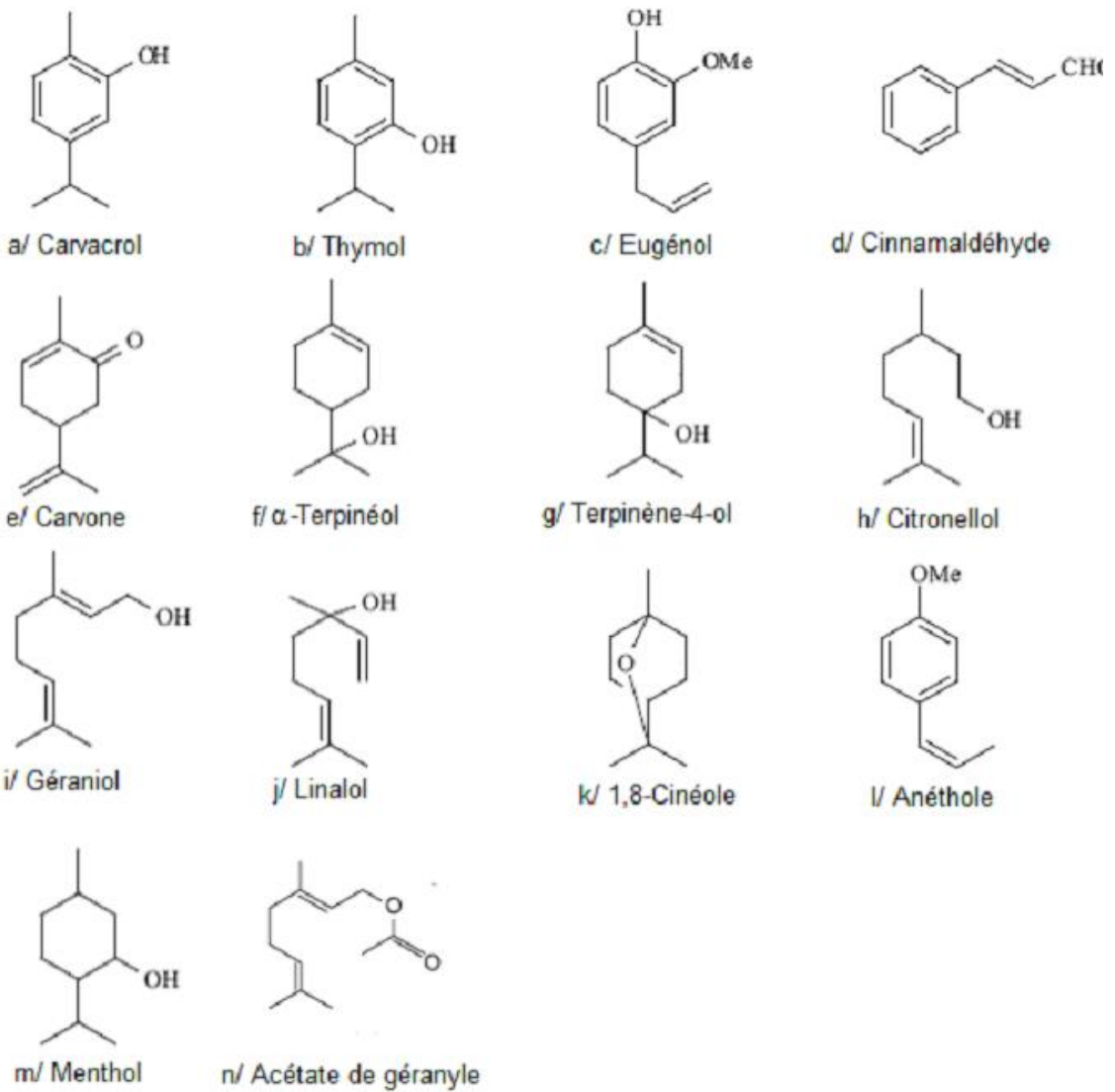
### ANNEXE 2

**Les principaux constituants des huiles essentielles à activité antibactérienne (Burt, 2004).**

Nom commun des plantes	Nom latin des plantes	Composés majoritaires des HEs	Composition (%)
coriandre	<i>Coriandrum sativum</i> (feuilles immatures)	linalol	26%
		(E)-2-décanal	20%
cannelle	<i>Coriandrum sativum</i> (graines)	linalol	70%
		<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	<i>trans</i> -cinnamaldéhyde
origan	<i>Origanum vulgare</i>	carvacrol	traces à 80%
		thymol	traces à 64%
		$\gamma$ -terpinène	2 à 52%
		<i>p</i> -cymène	traces à 52%
romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	$\alpha$ -pinène	2 à 25%
		acétate de bornyle	0 à 17%
		camphre	2 à 14%
		1,8-cinéole	3 à 89%
sauge	<i>Salvia officinalis</i> L.	camphre	6 à 15%
		$\alpha$ -pinène	4 à 5%
		$\beta$ -pinène	2 à 10%
		1,8-cinéole	6 à 14%
		$\alpha$ -thujone	20 à 42%
clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	eugénol	75 à 85%
		acétate d'eugényle	8 à 15%
thym	<i>Thymus officinalis</i>	thymol	10 à 64%
		carvacrol	2 à 11%
		$\gamma$ -terpinène	2 à 31%
		<i>p</i> -cymène	10 à 56%

ANNEXE 3

Composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles ( Kalembe et Kunicka, 2003).



# Annexes

## ANNEXE 4

### Principaux composés des huiles essentielles avec leurs caractéristiques

(Willem, 2004 in Bachelot *et al.*, 2006)

Nom del'élément biochimique	Caractéristiques	Quelques produits possédant ces éléments
Les acides	Anti-inflammatoires très puissants. Agissent en calmants du système nerveux.	On en trouve surtout dans le clou de Girofle et genévrier
Les aldéhydes	Intermédiaires entre alcools et cétones. Anti-inflammatoires. Calmants du système nerveux. Anti-infectieux. Peuvent irriter les muqueuses et la peau.	On en trouve dans le citron, la mélisse, la verveine des Indes, la coriandre douce, la cannelle de chine
Les cétones	Anti-inflammatoires. Anti-infectieux. Stimulent le système immunitaire à faible dose. Anti-coagulantes, cicatrisantes. Lipolytiques (fonte des graisses), calmantes. A forte dose peuvent être neurotoxiques. Les huiles essentielles riches en cétones ne doivent pas être employées seules.	On en trouve dans l'absinthe, la camomille noble, le fenouil, le romarin officinal, l'eucalyptus mentholé.
Les coumarines	Neuro-sédatives (calmantes pour le système nerveux). Anti-coagulantes. Les furo coumarines peuvent provoquer des tâches brunes sur la peau exposée au soleil. Les pyranocoumarines peuvent endommager le foie suivant les doses.	On trouve les coumarines dans l'angélique, le céleri, l'oranger doux et amer...
Les éthers	Ont une action antispasmodique. Effets antalgiques. Rééquilibrants nerveux (antidépresseur psychique). Inversion des effets si les doses sont trop fortes	On en trouve dans l'anis étoilé, l'estragon, le basilic, la rose de Damas.
Les esters	Antispasmodiques. Rééquilibrants nerveux. Anti-arythmiques. On en utilise souvent car présentent peu de dangers.	On en trouve dans le lavandin, la lavande officinale, le ylang-ylang, le géranium rose...
Les monoterpènes	Stimulants du système immunitaire. Ont des propriétés antiseptiques. Antalgiques à action percutanée. Action révulsive sur la peau donc utiles en cas de douleur localisée. Peuvent occasionner des brûlures importantes sur la peau donc leur action doit être limitée dans le temps.	On en trouve dans le thym, le cyprès, la sauge officinale... Diluer les huiles essentielles avec des mono terpènes dans des huiles végétales biologiques
Les monoterpénols	Action contre les microbes, les champignons, les virus et les bactéries. Utiles lorsqu'il fait stimuler le système nerveux. Ne brûlent pas la peau et ne sont pas toxiques pour le foie donc usage courant.	On en trouve dans le bois de rose, la camomille noble, l'eucalyptus, le lavandin, la marjolaine.
Les phénols	Anti-infectieux. Immunostimulants. Action contre les microbes, les champignons, les virus et les bactéries. Irritants pour la peau et muqueuses (peuvent entraîner des brûlures). Peuvent (en grande quantité) endommager le foie en détruisant les cellules hépatiques.	On en trouve dans le clou de Girofle, le thym, l'origan d'Espagne, le poivre noir...
Les sesquiterpènes	Anti-inflammatoires. Immunostimulants. Anti-allergiques. Emploi important en cosmétologie car ont une bonne tolérance avec la peau et ont des propriétés thérapeutiques.	On en trouve dans la mélisse, l'ylang-ylang, le cèdre d'Atlas.
Les sesquiterpénols	Stimulant généraux. Toniques. Microbicides.	On en trouve dans le patchouli, la grande carotte sauvage, le santal blanc.

## ANNEXE 5

### Milieux de culture utilisés

#### Gélose Nutritive

Extrait de viande de bœuf	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g

pH= 7,2 à 7,4

#### Bouillon Nutritive

Extrait de viande de bœuf	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g

pH= 7,2 à 7,4

#### Agar Mueller Hinton

Eau distillée .1000ml	
Infusion de viande de bœuf	02.0g
Hydrolysate de Caseine	17.5g
Amidon	1,5g
Agar	10g

pH= 7.4

#### Milieu sabouraud

Peptone	10g
Glucose	20g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml

---

# ARTICLE

## Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Nigella sativa* L. against Pathogens Bacteria

D. Hadjazi, K. Larbi Daouadji, F.Z.I. Reffas,  
M.L. Benine and B. Abbouni

Laboratory for Molecular Microbiology Proteomics and Health, Department of Biology,  
Faculty of Natural Science and life, University of Djillali Liabès of Sidi Bel Abbès, 22000-Algeria

**Abstract:** The essential oils of *N. sativa* have been commonly employed as a crude drug by people in Asia, Middle East and Africa. Due the development of antimicrobial resistance by the using of antibiotics among pathogenic bacteria, a natural products extracted from the plants can be used as alternative strategies to reduce pathogenic bacteria from foods and patients. The aim of this study is the evaluation of the antibacterial properties of the essential oils of *N. sativa* L, which were evaluated against pathogens bacteria *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* and *B. cereus*, by the using agar well diffusion method and by the study of bacterial growth in the absence and the presence of essential oils. The obtained results showed that the antibacterial activity of the essential oils of *N. sativa* L at various concentrations has indicated an excellent antibacterial activity by *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhi*, *E. aerogenes*, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *P. vulgaris* with a maximal diameter of inhibition zone 32, 15, 14.14, 13 mm respectively. Furthermore, the study of *S. aureus* ATCC 25923 and *P. vulgaris* growth in the absence (Control) and in the presence the essential oils of *N. sativa* has manifested a considerable biomass reduction accompanied with unbalanced growth after adding of the crude extract.

**Key words:** *Nigella sativa* • Antibacterial Activity • Essential Oils • Minimum Inhibitory Concentration

### INTRODUCTION

The widespread use of commercially available antimicrobials with prolonged use has negative effect on human health led to alarming increase in antibiotic resistance among microorganisms, thus necessitating the need for development of novel antimicrobials. Recent years have witnessed a renewed interest in exploring natural resources for developing such compounds [1-4]. Furthermore, since 1980 the introduction of new antimicrobials has declined due to the huge expense of developing and testing new drugs [5, 6].

*N. sativa* (Family Ranunculaceae) is a spice which is well known for its medicinal properties. It has been extensively in use for centuries in folk medicines, both as herb and for oil by people in Asia, Middle East and Africa for medicinal purposes. Seeds are used as a new source of

edible oils and food applications as spice and condiments in cakes, breads, pastries, curries, pickles and in seasoning etc. The seeds contain 40% fixed oil, a saponin (Melantin) and up to 1.4% volatile oil [7-9].

Black seed oil has been shown to be effective against a wide spectrum of organisms-bacteria like *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. abony* [10-14]. A few antimicrobial work of the volatile oil of the seeds of *N. sativa* has been reported [15, 16].

The main objective of this work is based on the study of the antibacterial properties of the essential oils of *N. sativa* L such pathogens bacteria: *E. coli*, *S. typhi*, *P. vulgaris*, *K. pneumonia*, *E. aerogenes*, *St. aureus*, *Listeria*, *B. cereus*, *Ps. aeruginosa* by the using agar well diffusion method and the growth of the tested bacterial growth in the presence and in the absence of the essential oils of *N. sativa* L.

**Corresponding Author:** B. Abbouni, Laboratory for Molecular Microbiology Proteomics and Health,  
Department of Biology, Faculty of Natural Science and Life,  
University of Djillali Liabès of Sidi Bel Abbès, 22000-Algeria.

## MATERIALS AND METHODS

**Extraction and Preparation of Oil:** *N. sativa* seeds were purchased from local market of Sidi Bel Abbès, Algeria and extraction of oil from *N. sativa* seeds was carried out by standard hydro distillation method from Cleavenger's apparatus and all operation were carried out at room temperature.

The crushed seed powder (200 g) was placed in a separate flask together with distilled water (1 L). After 5 to 6 h, the oil was collected from the apparatus and it was dehydrated by passing through anhydrous sodium sulphate for removal of water traces stored into dark bottle and at 4°C until use, yield was 0.35% (w/v). The essential oil was used for disc diffusion test and determination of minimum inhibitory concentration (MIC). Essential oils yield was calculated as follows:

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Weight of EO recovered}}{\text{Weight of spices}} \times 100$$

Each essential oil dilution (60 mg/mL) was prepared in (DMSO), followed by sterilization using a 0.45 µm membrane filter.

**Microbial Strains:** The used strains in this work were *E. coli*, *S. typhi*, *E. aerogenes*, *Ps. aeruginosa*, *P. vulgaris* (Gram negative) and *S. aureus*, *B. subtilis* (Gram positive) were provided from the bacteriological laboratory of the hospital CHU of Sidi Bel Abbès, Algeria. They were sub-cultured and used throughout the studies. Each of the bacterial specimens was incubated in liquid culture dilutions in Mueller Hinton Agar (MHA Oxoid- CM337) and incubated at 37°C for 20 min to reach the logarithmic phase, then measured to a 0.5 McFarland dilution (Standard concentrations), which delivered a final concentration of approximately 10<sup>5</sup> CFU per ml. Then the agar plates were inoculated with the essential oils of *N. sativa L* and incubated over night at 37°C [17].

**Determination of Antibacterial Activity:** The disc diffusion method described by Modzelewska *et al.* [18] was used for the investigation of the antibacterial activity. For this purpose, the MHA plates were prepared by pouring 15 mL of molten media into sterile petri dishes. Different concentrations of the essential oils of *N. sativa L* were prepared by dissolving in DMSO to obtain the following concentrations 16, 8, 4, 2, 1 µl. After that a sterile paper disc (6 mm) was placed on the surface of medium to allow the diffusion of the compounds of the

extract residue diluted into corresponding extraction solvents, so that each disc was impregnated with 6 µL of residue and the plates were kept for incubation at 37°C for 24 hours. The sensitivity of different bacterial strains to the essential oils was calculated by measuring of the diameter (In millimeters) of inhibition zone. Readings were taken at the end of 24 hours and 48 hours. Bacteria showing a clear zone of inhibition >6 mm were considered to be sensitive. Experiments have been achieved in triplicates for each combination of extract and the tested bacterial strain. Discs containing water and ethanol were used as controls. The antibacterial activity was evaluated by measuring the diameter of the inhibition zone formed around the discs.

**Disc Diffusion Assay:** Standardized inoculum of bacteria 0.1.10<sup>8</sup> cells per mL was spread on the solid media and nutrient Agar (NA) plates respectively with the help of sterile spreader. The inoculated plates were allowed to dry and sterile cork borer of diameter 8.0 mm was used to bore wells in center of inoculated agar plates. Subsequently, a 60 iL volume of oil of test spices were introduced in wells. Sterile DMSO served as the control. The plates were allowed to stand for 1 hour to diffuse and then incubated at 37°C for 24 h for bacteria. The zone of inhibition was recorded to the nearest size in mm.

**Determination of Minimum Inhibitory Concentration:** The minimum bactericidal concentration was performed to test the antibacterial activity of active extract by the using tube dilution method. The MIC was defined as lowest concentration able to kill any microbe. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the essential oil are determined according to the method reported by Pinto and Savadoro *et al.* [19, 20].

Dilutions of the essential oil of *N. sativa L* were prepared in sterile nutrient broth to get a final concentration of 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 µL respectively. To each of these dilutions, a loop full of bacterial culture adjusted to 0.5 McFarland standards was inoculated in Mueller Hinton Agar (MHA) and all the tubes were incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, loop full from each tube was inoculated onto nutrient agar plates. The plate without growth was recorded as MIC.

## RESULTS AND DISCUSSION

The development of drug resistance in human pathogens against commonly used antibiotics has necessitated a search for new antimicrobial substances from other sources including bacteria and fungi [21].

Table 1: Illustration of the antibacterial activity by the produced zone inhibition (mm) in the presence of the several concentrations of the essential oils of *N. sativa L* (mg/mL) against pathogen bacterial

Tested bacteria	The produced zone inhibition (mm) by the using of increasing concentration of essentials oils of <i>N.sativa L</i> (mg/ml).						
	0	1	2	4	6	8	12
<i>E. coli</i>	0	1	7	8	12	12	12
<i>S. typhi</i>	0	0	8	10	10	12	14
<i>P. vulgaris</i>	0	6.5	9	10	14	14	14
<i>K. pneumonia</i>	0	8	7	8	10	10	13
<i>E. aerogenes</i>	0	0	9	9	11	13	15
<i>Listeria</i>	0	7	7	8	10	11	13
<i>Ps. aeruginosa</i>	0	0	0	0	8	10	13
<i>St. aureus</i>	0	0	24	26	26	29	32
<i>Ba. cereus</i>	0	22	7	10	11	11	13



Fig. 1: The produced zone inhibition (mm) of the antibacterial activity of the essential oils of *N. sativa L* against *P. vulgaris* (left), *S. aureus* (center), *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 (right).

In the present study, the antibacterial activity of the essential oils of *N. sativa L* against various Gram positive and Gram negative bacteria has been investigated.

For the evaluation of the antibacterial activity of the essential oils of *N. sativa L*, the disc diffusion method, the determination of MIC and the bacterial growth in the presence and the absence of the essential oils have been studied.

The illustrated results in (Table 1 and Figure 1) revealed the essential oils of *N. sativa L* in the dilution of 1 to 16  $\mu$ l.

The obtained results on the antibacterial activity of the essential oils of *N. sativa L* has manifested clear inhibition zone of at least 7 mm for all the tested strains.

The obtained activity of the essential oils of *N. sativa L* at various concentrations against *S. aureus*, *B. cereus* and *E. coli*, *S. typhi*, *E. aerogenes*, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *P. vulgaris* has indicated an excellent antibacterial activity by *S. aureus* ATCC 25923, *E. aerogenes*, *S. typhi*, *P. vulgaris* and *B. cereus* ATCC 6633 with a maximal diameter of inhibition zone 32, 15, 14.14, 13 mm respectively.

The obtained results indicated that the essential oil of *N. sativa L* possesses a wide inhibition activity spectrum on pathogenic bacteria for humans. A more careful analysis should be performed *in vivo* in order to determine its real effects. In particular, the sesquiterpenes and their derivatives seem to be a promising class of natural compounds in the search for new antibacterial agent [14, 18].

Topozada *et al.* [12] has reported that *Salmonella* and *Pseudomonas* bacteria are very sensitive to the essential oil of *N. sativa L* and with the exception of *E. coli* ATCC 25922, other Gram negative strains are less sensitive than Gram positive strains.

Likewise, Singh *et al.* [22] has reported that the essential oils of *N. sativa* showed complete growth inhibition against *B. cereus*, *B. subtilis* and *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* by the agar well diffusion method. This resistance is due to the chemical composition of the wall which is rich in lipopolysaccharides not allowing the penetration of hydrophilic molecules.



Table 2: Determination of MIC of essential oil of *N. sativa L* against pathogen bacterial

Strains	Dilution		
	10 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
<i>E. coli</i>	+	++	+++
<i>S. typhi</i>	+	++	+++
<i>P. vulgaris</i>	+	++	+++
<i>K. pneumonia</i>	+	+	+++
<i>E. aerogenes</i>	+	++	+++
<i>Listeria</i>	+	+	+++
<i>Ps. aeruginosa</i>	+	+	+++
<i>St. aureus</i>	+	++	+++
<i>Ba. cereus</i>	+	++	+++

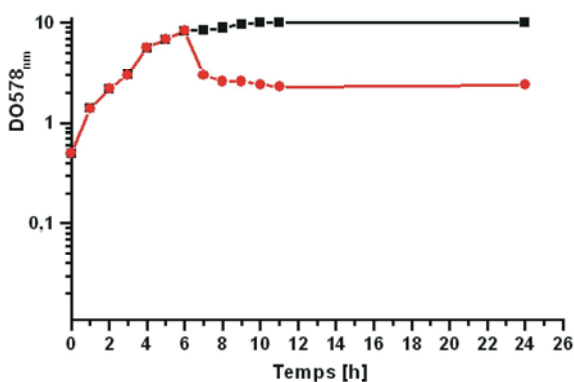


Fig. 2: The study of *St. aureus* growth, cultivated on seed medium, incubated at 30°C for 24 hours, in the presence (—■—) and in the absence (—●—) of the essential oils of *N. sativa L*.

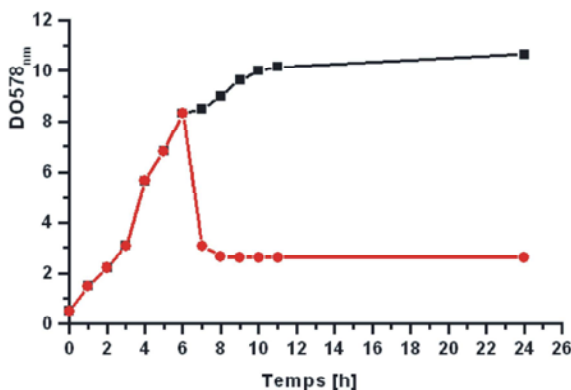


Fig. 3: The study of *P. vulgaris* growth, cultivated on seed medium, incubated at 30°C for 24 hours, in the presence (—■—) and in the absence (—●—) of the essential oils of *N. sativa L*.

For essential oils, the therapeutic dose is very close to the lethal dose, so that the calculation of CMI is very important. The obtained results are reported in Table 2. The MIC results depend on the strain tested and the dilution [23].

This antibacterial activity may be indicative of the presence of metabolic toxins or broad spectrum antibacterial compounds. This is in agreement with previous reports by the several researchers [24]. Furthermore, Olila *et al.* [25] has reported that the essential oil of *N. sativa* showed high inhibitory activity against a range of bacteria resistant to antibiotics. It may be related to the fact that gram positive bacteria such as *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* are more sensitive against antibacterial agents compared to the tested gram negative bacteria because of the difference in their cell wall structures [26]. In order to explore the effect of the compounds present in of the essential oils of *N. sativa* *Lin* tested pathogens bacteria, the bacterial growth of *S. aureus* and *P. vulgaris* in the absence (control) and in the presence of the essential oils of *N. sativa* has been investigated. For this purpose, *S. aureus* and *P. vulgaris* were inoculated in seed media with initial optical density of 0.5 at 578nm according the protocol described by Abbouni *et al.* [4], in the absence and in the presence of the essential oils of *N. sativa*, which was added 6 hours after the onset of the bacterial growth. The obtained results manifested (Figure 2, 3) showed a considerable inhibition of the growth of *S. aureus* and *P. vulgaris*, after the adding of the essential oils of *N. sativa* *Lin* in the early exponential growth phase. In conclusion, the molecules present in the essential oils of *N. sativa L* were able to induce unbalanced growth and further the arrest of the cell cycle of *S. aureus* and *P. vulgaris* in comparison with the untreated biomass with the crude extract (Balanced growth) [27, 28].

### CONCLUSION

A number of plants have been documented for their biological and antimicrobial properties. The most tested bacteria are characterized by the developing a resistance to commonly employed antibiotics and are a common cause of many enteric infections. Therefore, in the present study, the antibacterial activity of the essential oils of *N. sativa* has been investigated against a gram positive (*S. aureus*, *B. cereus*) and Gram negative bacteria such as *E. coli*, *S. typhi*, *E. aerogenes*, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *P. vulgaris*.

The tested essential oils of *N. sativa L* have manifested an important antibacterial activity by *S. aureus* ATCC 25923, *E. aerogenes*, *S. typhi*, *P. vulgaris* and *B. cereus* ATCC 6633 with a maximal diameter of inhibition zone 32, 15, 14.14, 13 mm respectively.

Therefore, a further studies involving the purification of the chemical compounds of the essential oils of *N. sativa L* by the using a modern technique such as Gas chromatography, HPLC, IRM, required for determination of the active metabolites present in the essential oils of *N. sativa L*.

#### ACKNOWLEDGEMENT

We are thankful to the department head of the bacteriology laboratory of hospital of University of Sidi Bel Abbès Mr. Harrachi Abdelkader for providing us with the bacterial strains. We would like to thank Prof. Dr. Mouffok Benali, Director of Laboratory for synthesis of the environmental Information, for your encouragement, your support and your useful discussion. Without the kind cooperation of the above mentioned people the work could not have been possible.

#### REFERENCES

1. Magee, K.A., Herbal and Therapy, 2005. a review of potential health risks and medicinal interactions. *OrthodCraniofac Res* May, 8: 60-74.
2. Duraipandiyar, V., M. Ayyanar and S. Ignacimuthu, 2006. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC ComplementAltern Med* Oct, 6: 35.
3. Das, K., R.K.S. Tiwari and D.K. Shrivastava, 2010. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 104-111.
4. Abbouni, B., H.M. Elhariry and G. Auling, 2003. Arrest of cell cycle by inhibition of ribonucleotide reductase induces accumulation of NAD by manganese supplemented growth of *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872. *Biotechnology letters*, 25: 143-147.
5. Thuille, N., M. Fille and M. Nagl, 2003. Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hyg. Environ Health* Jun, 20 6: 217-21.
6. Alanís, AD., F. Calzada, J.A. Cervantes, J. Torres and G.M. Ceballos, 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.*, 22(100): 153-7.
7. Brutis, M. and F. Bucar, 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res.*, 14: 323-8.
8. Gilani, A.H., Q. Jabeen and M. Khan, 2004. A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pak. J. Biol. Sci.*, 7: 441-51.
9. Chevallier, A., 1996. The encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersley Publishers, London, pp: 237.
10. Gurdip, S., P. Marimuthu, C.S. Heluani and D. Catalan, 2005. *C.S.O. J. Sci. Food Agric.*, 85: 2297-2306.
11. Damjanova, S., R. Encheve, A. Stojanova, N. Perofanova and F. Miziiski, 2002. *Hranitelno Vkusova Promishlenost.*, 5: 10-11.
12. Topozada, H.H., H.A. Mazloun and M. El-Dakhakhny, 1965. The antibacterial properties of *Nigella sativa* seeds. Active principle of some clinical applications. *J. Egypt. Med. Ass. Suppl*, 48: 187-202.
13. Taha, S., H. El-Alfy, M. Hamed, E. El-Fataty and M.A. Toama, 1975. Isolation and structure Assingment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *Nigella sativa L*. seeds. *Pharmazie*, 30: 109-11.
14. Agrawal, R., M.D. Khaya and R. Shryvastava, 1979. Antimicrobial anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian Journal of Experimental biology*.
15. Hanafy, M.S. and M.E. Hatem, 1991. Studies of an antibacterial activity of *Nigella sativa* (black cumin). *J. Ethnopharmacology*, 34: 275-278.
16. Hasan, C.M., M. Ahsan and S.N. Islam, 1989. *In-vitro* antimicrobial screening of the oils of *Nigella sativa* seeds. *Bangladesh J. Bot.*, 18: 172-174.
17. Moroh, J.L.A., C. Bahi, K. Djec, Y.G. Loukou and F. Guede-Guina, 2008. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morindaorindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 77: 44-61.
18. Modzelewska, A., S. Sur, K.S. Kumar and S.R. Khan, 2005. Sesquiterpenes: Natural products that deasease cancer growth. *Curr. Med. Chem. Anti-cancer Agents*, 5: 477-499.
19. Pinto, E., 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte spices. *J. Med. Microbiol.*, 55: 1367-1373.
20. Savadogo, A., Quattra, A.T. Cheik, H.N. Bassole Imerel and A. Traores, 2004. Antimicrobial activities of acid bacteria strain isolated from Burkina Fasso fermented milk. *Pak. J. Nutr.*, 3: 174-179.

21. Erdogrul, O.T., 2002. Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine. *Pharmaceutical Biology*, 40: 269-273.
22. Singh, G., P. Marimuthu, C.S.D. Heluani and C. Catalan, 2005. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *J. Sci. Food Agri*, 85: 2297-2306.
23. Mahariya, Sunita, Sharma and Meenakshi, 2013. Chemical composition and antidermatophytic activity of *Nigella sativa* essential oil. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(20): 1286-1292.
24. Randhawa, M.A. and M.J. Al Ghamdi, 2002. A review of pharmacotherapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pak. J. Med. Res.*, 41: 77-83.
25. Olila, D., Olwa-Odyek and J. Opuda-Asibo, 2001. Antibacterial and antifungal activities of extracts of *Zanthoxylumchalybeum* and *Warburgiaugandensis*, Ugandan medicinal plants. *Afr Health Sci.*, 1: 66-72.
26. Vishal, J., G.L. Viswanatha, D. Manohar and H.N. Shivaprasad, 2012, "Isolation of Antidiabetic Principle from Fruit Rinds of *Punica granatum*", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, pp: 1-11.
27. Abbouni, B., W. Oehlmann, P. Stolle, A.J. Pierik and G. Auling, 2009. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of the stable-free radical in the native metallo-cofactor of the manganese-ribonucleotide reductase (Mn-RNR) of *Corynebacterium glutamicum*. *Free Radical Research*, 43:943-950. [www.informaworld.com/smpp/title~db=all~content=t713642632](http://www.informaworld.com/smpp/title~db=all~content=t713642632).
28. Abbouni, B., H.M. Elhariry and G. Auling, 2004. Overproduction of  $\text{NAD}^+$  and 5'-inosine monophosphate in the presence of  $10 \mu\text{M}^2$  by a mutant of *Corynebacterium ammoniagenes* with thermosensitive nucleotide reduction ( $\text{nrd}^{\text{ts}}$ ) after temperature shift. *Archives of Microbiology*, 182: 119-125.