

République Algérienne Démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement Supérieur Et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID-TLEMEN



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Master II : Option Sciences des Aliments



MEMOIRE :

En vue de l'obtention du diplôme de master en Sciences des Aliments

Intitulé :

Caractérisation par HPLC de quelques composés chimique de l'huile de nigelle (*Nigella Sativa*), et recherche d'une activité antimicrobienne

- **Présenté par :**

Mr BENZINE Ouahid.

Directeur de mémoire : **Mr REBIAHI Sid Ahmed** Maitre de Conférences B

Mr AZZI R.

Maitre de Conférences B

Président

DIDI A.

Maitre Assistant A

Examineur

Année Universitaire : 2013 - 2014

Abstract

A method of HPLC was applied for detection the components pharmacologically active: the thymoquinone (TQ), dithymoquinone (DTQ), thymohydroquinone (THQ), and thymol (THY), in the seeds oil of *Nigella sativa*.

The evaluation of the antibacterial activity and antifungal of the oil of *nigella L.* and the oil of coloquinte, and seeks it of a possible interaction between these two oils.

Oils coming from the species *Nigella sativa* and *Citrullus colocynthis*, are tested on stocks of references: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10879, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Salmonella thyphimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebseilla pneumoniae* ATCC 700603, and *Candida albicans* ATCC 33210 by using the method of diffusion of the discs.

Only the oil of *Nigella sativa* presented an antimicrobial activity on three stocks (*S. aureus*, *B. cereus*, and *E. faecalis*) whose best inhibition was that on *S. aureus*. Thus no interaction was detected between various oils.

The fixed oil of *Nigella sativa* seems to be effective on the bacteria of the Gram flora positive.

The thymoquinone and thymol present in the oil of *nigelle* are antimicrobial molecules which can be perceived like an excellent alternative to the uses of antibiotics, because the latter lose their effectiveness by the phenomenon of resistance of the bacteria.

Key words : *Nigella sativa*, Quinones, Thymoquinone, Dithymoquinone, Thymohydroquinone, Thymol, Chromatography with reversed phase, *Citrullus colocynthis*, fixed oil, antimicrobial activity.

Résumé

Une méthode d'HPLC a été appliquée pour détecter les constituants pharmacologiquement actifs : la thymoquinone (TQ), dithymoquinone (DTQ), thymohydroquinone (THQ), et le thymol (THY), dans l'huile des graines de *Nigella sativa*.

L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile de nigelle et l'huile de coloquinte, et la recherche d'une éventuelle interaction entre ces deux huiles.

Les huiles provenant des espèces *Nigella sativa* et *Citrullus colocynthis*, ont été testées sur les souches de références : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10879, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, et *Candida albicans* ATCC 33210 en utilisant la méthode de diffusion des disques.

Seule l'huile de *Nigella sativa* a montré une activité antimicrobienne sur trois souches à Gram positif (*S. aureus*, *B. cereus*, et *E. faecalis*) dont la meilleure inhibition était celle sur *S. aureus*.

Aucune interaction n'a été détectée entre l'huile de nigelle et de coloquinte.

La thymoquinone et le thymol présents dans l'huile de nigelle sont des molécules antimicrobiennes qui peuvent être perçues comme une excellente alternative à l'usage d'antibiotiques, par ce que ces derniers perdent leurs efficacités par le phénomène de résistance des bactéries.

Mots clés : *Nigella sativa*, Quinones, Thymoquinone, Dithymoquinone, Thymohydroquinone, Thymol, Chromatographie à phase renversée, *Citrullus colocynthis*, l'huile fixe, activité antimicrobienne.

REMERCIEMENTS

Je tien tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui ma donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, je tien à remercier Mr REBIAHI S., mon encadreur. Son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail. Vous m'avez fait confiance en acceptant de me guider dans la réalisation de ce travail qui est d'ailleurs le votre. J'ai bénéficié de vos qualités pédagogiques et humaines.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche, en acceptant d'examiner mon travail Et de l'enrichir par leurs propositions.

En fin, il est agréable d'exprimer mes sincères reconnaissances à tous ceux qui mon apporté de près ou de loin, aide et conseils lors de l'élaboration de ce mémoire de master.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction général	P1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I. PRÉSENTATION DE <i>NIGELLA SATIVA</i> (LA NIGELLE)	P3
I.1. Généralité	P 3
I.2. Historique	P3
I.3. Les différentes espèces de nigella L.	P5
I.4. Description botanique	P5
I.5. Culture	P8
I.6. L'utilisations	P8
I.6.1. Usages comme épice	P8
I.6.2. préparations à base de <i>Nigella sativa</i> L. selon Ibn Al-Qaîm	P9
I.7. Toxicité	P10
II. COMPOSITION CHIMIQUE DES GRAINES DE <i>N. SATIVA</i>	P11
II.1. Composition générale	P11
II.1.1. Les Protéines	P12
II.1.2. Les vitamines et les sels minéraux	P14
II.2. L'huile	P14
II.2.1. L'huile fixe	P14
II.2.2. L'huile essentielle	P17
II.3. Composés aromatiques	P18
II.4. Saponosides	P19

SOMMAIRE

II.5. Polyphénols et flavonoïdes	P19
II.6. Alcaloïdes	P20
III. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DES GRAINES DE <i>NIGELLA SATIVA</i>	
P23	
III.1. Activité antioxydante	P21
III.1.1. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	P21
III.1.2. Activité antioxydante <i>in vivo</i>	P23
III.2. Effets sur le système immunitaire	P23
III.3. Effets anti-inflammatoire et analgésique	P24
III.4. Activité anti-microbienne	P25
III.5. Effets anticancéreux et antimutagène	P26
III.6. Effets sur le système gastro-intestinal	P27
III.7. Effets sur le système respiratoire	P27
III.8. Activité antidiabétique	P28
III.9. Autres actions biologiques de <i>N. sativa</i>	P29

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. MATERIELS	P30
I.1. Matériel biologique	P30
I.2. Milieux de culture et solution de dilution	P31
I.3. Produits chimiques et matériaux	P31
I.4. Appareillage	P32
I.5. Colonne	P33

SOMMAIRE

II. METHODES	P34
II.1. Méthode de l'analyse d'HPLC	P34
II.1.1. Conditions chromatographiques	P34
II.1.2. Mode opératoire	P35
1.2.1. Préparation de l'échantillon d'huile de nigelle	P35
1.2.2. Préparation de la phase mobile	P36
1.2.3. Mise en marche du système d'HPLC	P37
❖ Test N° 01 : détection du composant THQ	P37
❖ Test N° 02 : détections des composés TQ, DTQ, THY	P40
II.1.3. Analyses qualitatives et quantitatives	P40
II.2. Méthode de l'évaluation de l'activité antimicrobienne	P41
II.2.1. Isolement et purification	P41
II.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile de nigelle et l'huile de Coloquinte	P47
II.2.2.1. Test de synergie de pouvoir antimicrobien des deux huiles	P43
2.2.1.1. Préparation de l'inoculum	P43
2.2.1.2. Ensemencement	P44
2.2.1.3. Dépôt de disques	P44

Chapitre III : Résultats et discussion

I. RESULTATS	P45
I.1. Résultats de l'analyse d'HPLC	P45
I.1.1. Chromatographie	P45

SOMMAIRE

I.2. Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne	P49
I.2.1. Isolement et purification	P49
I.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des deux huiles végétales	P50
I.2.2.1. Test de synergie de pouvoir antimicrobien de l'huile de nigelle et l'huile de coloquinte	P50
❖ Résultat de l'activité antimicrobienne de l'huile de <i>N. sativa</i> sur les souches à Gram positif	P52
❖ Résultat négatif de l'activité antimicrobienne de l'huile de <i>N. sativa</i> sur les souches à Gram négatif	P53
II. DISCUSSION	P55
II.1. Discussion des résultats de l'analyse d'HPLC	P55
II.1.1. Discussion des Chromatogrammes	P55
II.1.2. Discussion de la quantification	P57
II.2. Discussion des résultats de l'activité antimicrobienne	P60
II.2.1. L'huile de Nigelle	P60
II.2.2. L'huile de coloquinte (Citrullus colocynthis)	P64
CONCLUSION	P66
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	P68
ANNEXES	

Liste des abréviations

ATCC : Américain Type of Culture Collection

BEA : bile esculine agar (gélose)

BHIB : Bouillon cœur cerveau

BN : Bouillon Nutritif

C : Carbone

DL50 : Dose létal 50

DO : densité optique

DTQ :dithymoquinone

GNI : Gélose Nutritive Inclinée

h : heure

H : huile

λ : longueur d'onde

HPLC : chromatographie liquide sous haute pression

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

IP : injection intra-péritonéale

mg : Milligramme

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

nm : nanomètre

N. sativa L :*Nigella sativa* L

PM : Phase mobile

PO : Par voie oral

PS : phase stationnaire

THQ :thymoquinone

THY: thymol

TQ :thymoquinone

UFC : Unité Formantune Colonie

µg : microgramme

µl :microlitre

µm : micromètre

UV : lumière ultra violette

V : volume

ZD: Zone d'inhibition

Liste des Figures

Figure N° 01 : Fleur de *Nigella sativa* L. **P6**

Figure N° 02 : Aspect morphologique de la plante *Nigella sativa*. **P07**

Figure N° 03 : Graines de *N. sativa*. **P07**

Figure N° 04 : *Panch phoron*. **P09**

Figure N° 05 : Représentation chimique de la thymoquinone et de ses dérivés retrouvés dans l'huile essentielle de *N. sativa* L. **P18**

Figure N° 06: Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de *N.sativa* L. **P20**

Figure N° 07 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de *N. sativa* L. **P21**

Figure N° 08 : Photo personnelle; Appareil d'HPLC. **P32**

Figure N° 09 : Photo personnelle; Système d'HPLC. **P33**

Figure N° 10 : Photo personnelle; Colonne d'HPLC C18 125. **P33**

Figure N° 11 : Photo personnelle; Filtration de l'échantillon d'huile de nigelle. **P33**

Figure N° 12 : Photo personnelle; Phase mobile utilisée. **P36**

Figure N° 13 : Photos personnelles; Phase de chargement de la boucle. **P37**

Figure N° 14 : Photos personnelles; Phase d'injection de l'échantillon. **P38**

Figure N° 15 : Photo personnelle; vanne d'injection fermée. **P39**

Figure N° 16 : Disposition des disques. **P39**

Fig. 17 : chromatogramme de l'échantillon d'huile purifiée de graines de *N. sativa*, La détection a été effectuée à λ_{294} . **P47**

Fig. 18 : chromatogramme de l'échantillon d'huile purifiée des graines de *N. sativa*, La détection a été effectuée à λ_{254} . **P48**

Figure N° 19 : Photo personnelle; ZD de l'huile de nigelle sur *S. aureus*. **P52**

Figure N° 20 : Photo personnelle; ZD de l'huile de nigelle sur *B. cereus*. **P52**

Figure N° 21 : Photo personnelle; ZD de l'huile de nigelle sur *E. faecalis*. **P52**

Figure N° 22 : Photo personnelle; Résultat négatif pour la boîte de *E. coli*. **P53**

Figure N° 23 : Photo personnelle; Résultat négatif pour la boîte de *S. thyphimurium*. **P53**

Figure N° 24 : Photo personnelle; Résultat négatif pour la boîte de *A. baumani*. **P53**

Figure N° 25 : Photo personnelle; Résultat négatif pour la boîte de *K. pneumoniae*. **P53**

Figure N° 26 : Photo personnelle; Résultat négatif pour la boîte de *P. aeruginosa* **P54**

Figure N° 27 : Photo personnelle; Résultat négatif pour la boîte de *P. mirabilis* **P54**

Figure N° 28 : Photo personnelle; Résultat négatif pour la boîte de *C. albicans* **P54**

Liste des tableaux

Tableau N° 01 : Composition des graines de *Nigella sativa*. **P12**

Tableau N° 02 : Répartition en acides aminés des protéines de graines de *Nigella sativa*. **P13**

Tableau N° 03 : Les principaux phospholipides d'huile fixe de *Nigella sativa*. **P15**

Tableau N° 04 : Composition en acides gras des graines de *Nigella sativa* d'Arabie. **P16**

Tableau N° 05 : Les composés de monoterpènes d'huile essentielle de *Nigella sativa*. **P17**

Tableau N° 06 : Nature et origine du matériel biologique utilisé. **P30**

Tableau N° 07 : Les conditions chromatographiques utilisés. **P34**

Tableau N° 08 : Milieux de culture spécifiques pour l'isolement et la croissance des différentes souches de référence. **P42**

Tableau N° 09 : Les composants de l'échantillon de l'huile filtrée des graines de *N. sativa* détectés à 294 et 254 nm. **P46**

Tableau N° 10 : Aspect général des souches sur les différents milieux utilisés. **P49**

Tableau N° 11 : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile de *N. sativa* sur les dix souches utilisées. **P51**

Tableau N° 12 : Teneur en quinones d'une huile commerciale de graines de *Nigella sativa*. **P57**

Dans l'antiquité, l'homme utilisait les plantes pour se nourrir et se soigner. Alors qu'aujourd'hui, la science confirme les différentes vertus des extraits des plantes médicinales et leurs applications multiformes : industrie pharmaceutique ("l'aromathérapie" ; qui consiste à utiliser les huiles essentielles pour le traitement de diverses manifestations pathologiques), aussi comme additif pour l'alimentation, les cosmétiques et les détergents.

Au cours de ces dernières années, nous avons remarqué que les gens s'intéressent beaucoup plus à l'usage des plantes médicinales et ces pour plusieurs raisons. D'abord son coût inférieur par rapport aux médicaments de synthèse, ensuite elles arrivent à un moment où le public est désillusionné devant la médecine moderne qui ne trouve pas de remède à tous les maux et qui crée une panoplie d'effets secondaires liés à l'usage des médicaments.

Nigella sativa est l'une des plantes médicinales la plus utilisée à travers le monde. Depuis plus de 2000 ans, cette plante a été employé comme remède naturel au Moyen-Orient et en Extrême-Orient, et plus particulièrement chez les musulmans influencés par la parole prophétique « *Soignez-vous en utilisant la graine de nigelle, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort ...* ». Les extraits de ses graines sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle pour traiter les troubles broncho-pulmonaires et gastro-intestinaux, et contre plusieurs pathologies notamment comme antidiabétique, antihypertenseur, anti-inflammatoire et antimicrobiennes.

En raison de leur large domaine d'usage médicinal, les graines de *Nigella sativa* ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques intensives dans le but d'identifier ses principes actifs.

Alors que l'analyse de la composition chimique de l'huile de nigelle a été menée dans le laboratoire de recherche, l'analyse de l'activité antimicrobienne de cette huile a été réalisée dans le laboratoire de microbiologie alimentaire de l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen.

Le but de cette étude est d'une part, l'identification de quelques composés chimiques responsables des propriétés antimicrobiennes de l'huile de nigelle et d'autre part, évaluer l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile de nigelle et de

Introduction général

Coloquinte sur dix souches microbiennes à fin de déterminer une synergie entre ces deux huiles.

Pour cela, notre démarche s'articule par les étapes suivantes :

- 1) Elaboration d'une analyse de chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) pour caractériser quelques composés chimiques pharmacologiquement actifs dans l'huile des graines de *Nigella sativa*.
- 2) Isolement et purification bactérienne.
- 3) Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile de nigelle et de Coloquinte.
- 4) Test de synergie de pouvoir antimicrobien des deux huiles végétales.

I. PRÉSENTATION DE *NIGELLA SATIVA* (LA NIGELLE)

I.1. Généralités

Du latin *nigellus* “noirâtres”, la nigelle nous offre ses petites graines aromatiques menées d'un noir intense communément connues sous le nom de « cumin noir », black seed en Anglais, *Habbat el baraka* ou encore *El habbah sauda* dans les pays arabes, *Sinouj* en Algérie (**Ghedira, 2006**).

Nigella sativa L, est une plante herbacée appartenant à la famille des Renonculacées (**Guignard, 2001**). C'est une herbe originaire du moyen orient, de l'Europe centrale et de l'ouest de l'Asie, elle est maintenant cultivée dans plusieurs régions du monde surtout dans le bassin méditerranéen et en Inde (**Meziti, 2009**).

Elle se développe sur les terres semi-arides au sein de communautés naturelles où prédominent les thérophytes (**Antuono et hamaza., 2002 ; Badary et al., 2003**).

Elle est utilisée comme une herbe aromatique populaire et épice culinaire.

Traditionnellement, elle est utilisée en tant que remède naturel pour un certain nombre de maladies qui incluent l'asthme, la toux, l'hypertension, la bronchite, le diabète, les maux de tête, l'eczéma, la fièvre, les inflammations, et d'autres maladies (**Ali et Blunden, 2003**).

La graine ou l'huile qui en est issue est employée aussi comme diurétique, carminatif, cholagogue et vermifuge (**Ghedira, 2006**).

I.2. Historique

La nigelle tient une place importante parmi les plantes médicinales les plus utilisées et ce, depuis plus que 2000 ans. Elle était le «*Chanquit*» des anciens égyptiens. Elle est citée dans leurs papyrus comme un médicament pour les maladies pulmonaires et la toux (**Benhaddou, 2009**). Des archéologues ont trouvé une fiole d'huile de cumin noir dans le tombeau du Pharaon Toutânkhamon (v.-1353 à -1343). Selon certaines sources, cette huile était utilisée comme produit de beauté par Cléopâtre et Néfertiti. C'était aussi l'un des précieux remèdes prodigués par les médecins personnels des

pharaons qu'ils exploitaient pour son action digestive après les repas copieux et aussi contre les maux de tête, de dents, les infections diverses, les inflammations et allergies en tous genres (**Saidi, 2010**).

La civilisation gréco-romaine a également excellé en terme de thérapie par les plantes, notamment grâce à Hippocrate (460-377 av. J.-C.), surnommé le père de la médecine. Son *Corpus Hippocraticum*, un ensemble de textes, mentionne près de 400 remèdes à base de plantes dont la nigelle (**Chamseddine, 2006**).

Discorde, préconisait l'usage des graines de *N. sativa* contre les maux de tête, les affections des yeux, les maux des dents et les morsures d'araignées. Galien conseilla de les brûler pour tuer les moucheron et les moustiques et Tragus les employait comme antihelminthiques (**Benhaddou, 2009**).

La popularité de la nigelle était raisonnée par la croyance idéologique de pouvoir guérir plusieurs maladies. En fait, cette plante a occupé une place spéciale pour son grand spectre d'application médicale dans la civilisation islamique, dû au hadîth du **prophète Mohammed (salut et miséricorde soit sur lui)**, ces paroles sont restées pour longtemps un mystère pour la science jusqu'à l'arrivée des techniques modernes qui ont réussi à prouver les vertus thérapeutiques des graines de cette plante miraculeuse (**Meziti, 2009**).

L'un de ses disciples, Ibn Atîq, avait utilisé les graines de *N. sativa* macérées dans l'huile d'olive. On instillait trois gouttes de cette huile dans chaque orifice nasal pour traiter la grippe qui s'accompagnait d'éternuements en salves (**Alami, 1989**).

Abu Ali Al-Hussein Ibn Abdallah Ibn Sina, connu sous le nom d'Avicenne (980-1037), traite de la nigelle dans son ouvrage « le Livre de la guérison de l'âme » ou « *Kitab Al-Chifâ* ». Il conseillait de griller les graines et de les réduire en poudre, puis de placer cette préparation dans une bourse en tissu et d'inhaler quotidiennement pour désobstruer les voies nasales, selon le même principe qu'un vaporisateur (**Al-Nassimi, 1984**).

Avicenne préconisait aussi la nigelle dans la dyspnée et dans le traitement de l'asthme et des bronchites. Cette même préparation, prise avec de l'eau bouillie, possède des actions diurétiques et dissolvantes des calculs rénaux (**Ibn-Sina, 1972**).

D'autre part, la prise de l'huile de nigelle avec de l'huile d'olive était très réputée comme aphrodisiaque. À la nigelle on reconnaît aussi des propriétés emménagogues, galactagogues, abortives, vermifuges et ténicides.

Les graines de *N. sativa*, pulvérisées et utilisées en cataplasme avec du vinaigre, auraient une action résolutive dans les pustules et la gale surinfectée et auraient une action verrucide, si on ajoute du miel (**Ibn Al-Qaïm, 1957**).

Enfin, les médecins arabes connaissaient la toxicité de *N. sativa* à forte dose. De ce fait, ils recommandaient de ne pas dépasser une dose unitaire d'un demi-*Dirham* (1,62 g) et une dose journalière de deux *Dirhams* (6,48 g).

I.3. Les différentes espèces de *nigella* L.

Différentes approches taxonomiques ont abouti à un assemblage de nombreux synonymes. À la première description de ce genre seulement six espèces ont été enregistrées par Linné en 1753, et maintenant on voit plus de quatre-vingt noms selon Zohary en 1983. Les espèces sont divisées en trois groupes : *Erobathos*, *Nigella ria* et *Nigella strum* (**Tutin, 1964 ; Zohary, 1983**).

I.4. Description botanique de *Nigella sativa* L

Nigella sativa est une plante annuelle herbacée atteignant 30 à 60 cm de haut. Les feuilles pennatiséquées, divisées en lobes étroits, elles sont lancéolées à linéaires et présentent des onglets nectarifères, les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes et les supérieures sont longues (**Bonnier, 1990 ; Ghedira, 2006**).

Les fleurs sont solitaires, axillaires et terminales, bisexuées, radiales, très riches en Nectar (**Bonnier, 1990**). Elles sont petites à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle (**Ghedira, 2006**).



Figure N° 01 : Fleur de *Nigella sativa* L. (anonyme, 2012).

La plante est hermaphrodite à reproduction autonome dont le fruit est une capsule formée de 3 à 6 carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants **(Bonnier, 1990)**.

Chaque capsule contient plusieurs graines triangulaires blanchâtres et à maturité, elles s'ouvrent et l'exposition des graines à l'air les rend noire, ses graines sont ovoïdes de 2 à 3.5 mm présentent 3 à 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée **(Ghedira, 2006)**. Au broyage elles dégagent une odeur fortement aromatique, tenant du poivre et de l'anis et aussi de la noix de muscade **(Wichtl, 2003)**.

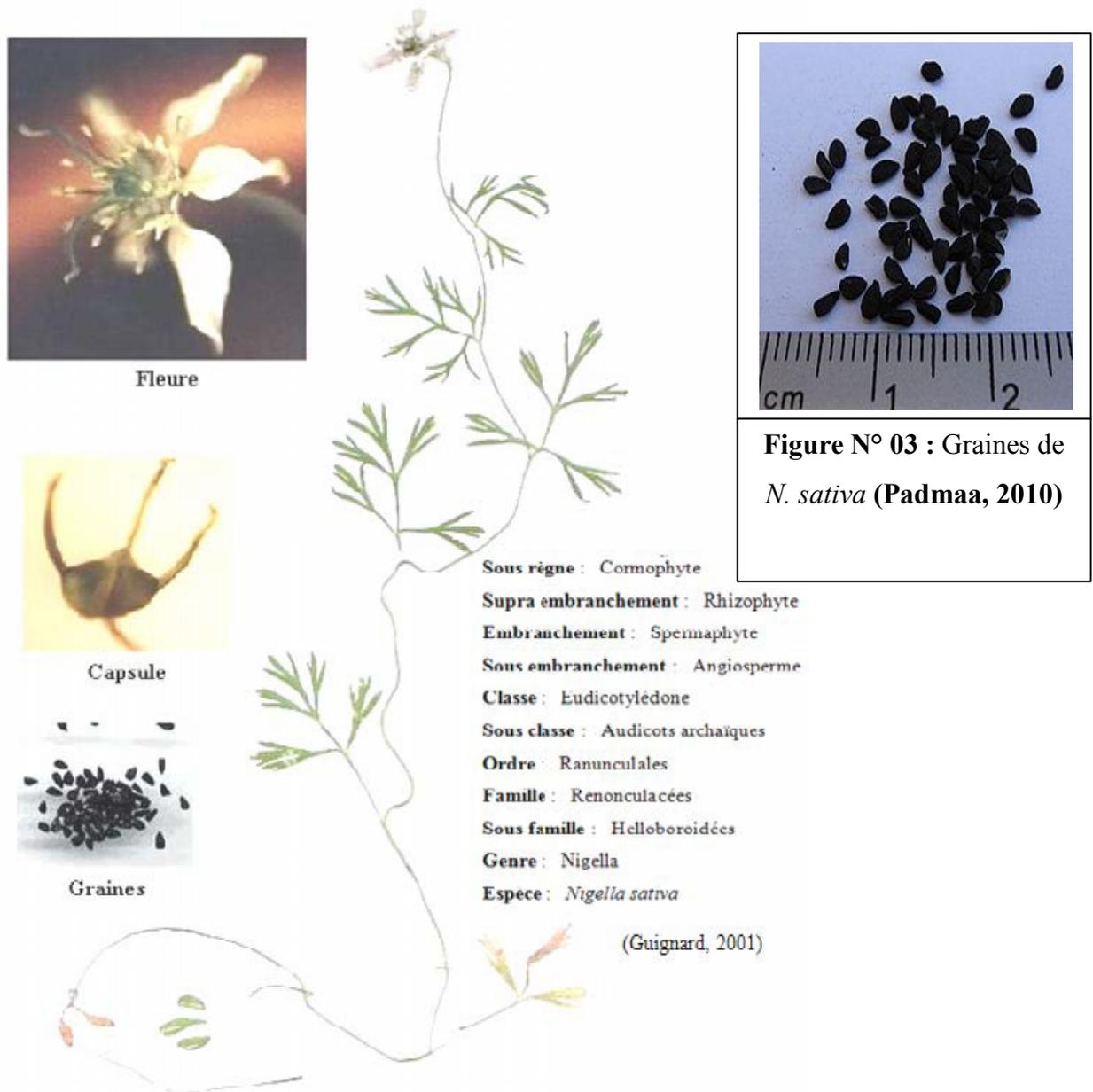


Figure N°02 : Aspect morphologique de la plante *Nigella sativa* (Meziti, 2009).

Selon la classification botanique des Angiospermes de Cronquist (1988) basée sur les critères morphologiques, anatomiques et chimiques, *Nigella* est une plante à graines, donc elle fait partie de l'embranchement des Spermaphytes.

La famille des renonculacées comprend une trentaine de genres et environ 1200 espèces (Negre, 1962).

Le genre *Nigella* L. (Ranunculaceae) inclut environ 20 espèces diffusées dans les régions méditerranéennes et en Asie occidentale (Kökdil, 2005).

Sous règne : Cormophyte

Supra embranchement : Rhizophyte

Embranchement : Spermaphyte

Sous embranchement : Angiosperme

Classe : Eudicotylédone

Sous classe : Audicots archaïques

Ordre : Renonculacées

Famille : Renonculacées

Sous famille : Helloboroidées

Genre : *Nigella*

Espèce : *Nigella sativa* (Guignard, 2001).

I.5. Culture

La plante pousse sur les terres semis arides au sein de communautés naturelles où prédominent les thérophytes (Antuono et Hamaza., 2002 ; Badary *et al.*, 2003).

Les graines sont semées en général au printemps, elles commencent leur germination dans les trois à quatre semaines. Après environ six mois de croissance végétative, la floraison apparaît et les graines continuent leur maturation pendant un bon mois encore. Dès le jaunissement des feuilles, le brunissement des follicules, la récolte peut être faite à l'automne pour séchage à l'ombre (Anton, 2005).

Dans les régions chaudes, avec un hiver doux, comme en Inde, les graines sont semées en automne-hiver pour une récolte au printemps-été.

I.6. L'utilisation

I.6.1. Usages comme épice

Les graines de nigelle entières ou moulues sont utilisées comme épice. Elles servent à saupoudrer le pain, le *Naan* (pain de régions d'Asie centrale et du sud) et les pâtisseries, les plats sucrés, les fromages, les sauces et les soupes pour les rendre plus

appétissants. Elles sont également utilisées en accompagnement des graines de sésame dans la cuisine traditionnelle d'Asie, et sont ajoutées à différents plats selon les envies (Vonarburg, 1998).

Dans la région du Bengale, entre l'Inde et le Bangladesh, le cumin noir entre dans les recettes de légumes secs et dans la composition de certains mélanges d'épices comme le *panchphoron*, composé de cinq épices : le cumin, le fenouil, la moutarde, le fenugrec et la nigelle (Panchphoron, 2012).



Figure N°04 : *Panchphoron*, d'après (Panchphoron, 2012).

En Afrique du nord, la graine de nigelle moulue entre dans la composition du *ras el hanout*, un mélange de 24 à 27 épices. En Égypte, les graines pulvérisées aromatisent le café à raison de 6 cuillères à café pour une cuillère de nigelle. En France, on l'utilise comme le poivre (Vonarburg, 1998).

I.6.2. préparations à base de *Nigella sativa* L. selon Ibn Al-Qaîm

Ibn al-Qayyim affirme dans le chapitre « La médecine prophétique » de son ouvrage « Le bagage pour l'au-delà » que L'application de l'huile de nigelle avec d'autres éléments (l'huile d'olive, du miel d'abeille, de la graines de girofle et d'orge pilées,

ainsi que le vinaigre) peuvent soigner plusieurs maladies telles que le rhume, la migraine hémicéphalique, le mal de dent, le traitement de l'insomnie et de l'insuffisance respiratoire, l'asthme, l'hypertension, les maux de l'estomac et des intestins, les courbatures...etc. (**Blumenthal et al., 2002**).

I.7. Toxicité

La toxicité de la nigelle est bien connue par la plupart des herboristes. En effet, son utilisation est seulement à faible dose, que ce soit par la voie interne, externe, en fumigation ou en inhalation. Un surdosage des graines de *N. sativa* peut être mortel (**Zaghlol et al., 2012**).

D'après (**Meziti, 2009**) le surdosage thérapeutique peut provoquer des avortements. Cette toxicité, comme celles de la plupart des espèces de la famille des renonculacées, est due essentiellement à la présence de forte quantité de saponines et d'alcaloïdes dans les graines de nigelle. **Tenekoon et al (1991)**, ont étudié la toxicité des extraits aqueux et alcooliques de *N. sativa*. Les concentrations plasmatiques de γ -glutamyl transférase (GGT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) ont été augmentées chez le rat après un traitement oral durant 14 jours; ce pendant aucune anomalie histologique n'a été observée chez ces rats (**Tenekoon et al., 1991 ; Meziti, 2009**).

Les propriétés toxiques de la thymoquinone (TQ) et de la thymohydroquinone (THQ) ont été étudiées chez le rat par injection intra-péritonéale afin de déterminer leur DL50 (Dose Létale médiane). La TQ avec une DL50 à 10 mg/kg de poids corporel, serait plus toxique que la THQ à 25 mg/kg (**El-Dakhakhny, 1965**).

Selon (**Zaoui et al., 2002**) les huiles fixes présentent une DL50 de 28,8 ml/kg (po) et 2,06 ml/kg (IP). Dans le même sens, la toxicité chronique de 2 mL/kg des huiles durant 12 semaines présente des valeurs normales pour les ALAT, les GGT et l'aspartate amino transférase (ASAT) (**Zaoui et al., 2002 ; Meziti., 2009**).

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

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

II. COMPOSITION CHIMIQUE DES GRAINES DE *NIGELLA SATIVA*

Les recherches sur la composition des graines de *N. sativa* ont débuté en 1880 avec Greenish, qui publia le premier rapport mentionnant la présence de 37% d'huiles et 4,1% d'éléments minéraux (**Greenish, 1880**).

Par la suite, des études ont montré la présence d'une diversité de substances naturelles regroupant des lipides, des dérivés terpéniques, des flavonoïdes, des alcaloïdes et des saponines. *N. sativa* constitue également une importante source de protéines et de sels minéraux : phosphore, calcium, potassium, magnésium et sodium, dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'études (extraction et détection). (**Aboutabl, 1986**).

Aujourd'hui, la composition et les propriétés de l'espèce *N. sativa* ont été assez bien étudiées. Les graines contiennent une huile volatile jaunâtre, une huile fixe, des protéines, des acides aminés, les sucres réducteurs, le mucilage, les alcaloïdes, les acides organiques, les tannins, les résines, le glucoside toxique, le metarbin, les principes amers, la saponine glycosidale, les fibres brutes, les minéraux, et les vitamines (**Pirasa et al., 2013**).

II.1. Composition générale

La composition générale des graines de *N. sativa* montre une teneur relativement importante en glucides (33-34 %), en lipides avec (30-35 %) et en protéines avec (16-21%). Les graines de *N. sativa* étant très utilisées dans l'alimentation, ces données permettent déjà de les qualifier comme ayant une bonne valeur nutritive (**Nergiz, 1991**).

Une approximation de la composition chimique est donnée dans le tableau n° 1 ;

Tableau N°01 : Composition des graines de *Nigella sativa*, d'après :

(Ansari, 1988 ; Aljassir, 1992).

Constituant	Quantité (%)
Lipides	30 - 35
Protéines	16 - 21
Glucides	33 - 34
Fibres alimentaires	4,5 - 6,5
Sels minéraux	3,7 - 7
Saponines	0,013

II.1.1. Les protéines

Les graines de *Nigella sativa* sont très riches en protéines (environ 16 %). Les acides aminés les plus dominants sont de l'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18%) (Meziti, 2009). Le fractionnement de ces derniers par SDS-PAGE montre des bandes de poids moléculaire compris entre 10 et 94 KDa. La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse des réactions de transestérification (Tuter *et al.*, 2003 ; Meziti, 2009).

L'analyse des acides aminés de l'hydrolysate de ces protéines révèle la présence de 17 acides aminés y compris les 8 acides aminés essentiels (Meziti, 2009) ;

Tableau N°02: Répartition en acides aminés des protéines de graines de *Nigella sativa* (Al-Jassir, 1992).

ACIDES AMINES	% de contribution à l'apport protéique
Acides aminés essentiels	
leucine	5,82
valine	4,61
lysine	4,04
thréonine	3,65
phénylalanine	3,61
isoleucine	3,46
histidine	3,35
méthionine	1,65
total AAE	30,19
Acides aminés non Essentiels	
acide glutamique	24,74
arginine	9,19
acide aspartique	8,94
glycine	5,61
proline	4,90
sérine	4,31
alanine	3,73
tyrosine	3,59
ammonium	2,84
cystine	1,96
total AANE	69,81

II.1.2. Les vitamines et les sels minéraux

La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines B₁, B₂, B₆, PP et de l'acide folique (Nergiz et Ötles, 1993).

Les tocophérols totaux constituent 0,05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48%) et du γ -tocophérol (28%) (Ramadan et Mörsel, 2002b). Ces mêmes chercheurs ont pu également identifier d'autres vitamines liposolubles; la vitamine A (0,05%) et la vitamine K (0,1%).

Dans une étude ultérieure, Al-Saleh *et al* (2006) ont affirmé après analyse par HPLC que les teneurs en α et γ -tocophérols sont relativement élevées: de 5,65 à 11,39 et de 2,26 à 6,95 mg/kg respectivement alors que celle de all-trans-rétinol est très faible de 0 à 0,54 mg /kg des graines.

Des travaux sur la composition minérale de la graine de *N. sativa* ont rapporté que sa teneur en potassium est importante (1.18 % de poids total de la graine) et que le calcium, le fer, le sodium représentent 0.188, 0.0575, et 0.0853 % respectivement (Nergiz et Ötles, 1993), la teneur des graines en sélénium a été également déterminée, elle représente 0,27-0,54 mg/kg des graines (Al-Saleh *et al* 2006).

Une autre étude confirme l'absence de métaux lourds (cadmium, plomb et arsenic) dans les graines de *Nigella sativa* (Al-Jassir, 1992).

II.2.L'huile

Les graines de *N. sativa* renferment environ 0,4-2,5% d'huile essentielle, plus de 30% d'huiles fixes (Dominiczak, 1991 ; Hashim, 1982) et 38% de lipides totaux dont les phospholipides (Martin, 2001).

II.2.1. L'huile fixe

L'huile fixe représente 37,9-39,2% du poids de la graine. Elle est constituée principalement de lipides neutres 96,1% - 97,2%, de lipides polaires 3%, et de phospholipides 0,32 - 1,05% (Ramadan et Mörsel, 2002).

L'analyse des phospholipides (PL) par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a permis d'identifier principalement sept constituants qui sont regroupés dans le tableau n° 3 ;

Tableau N° 03 : Les principaux phospholipides d'huile fixe de *Nigella sativa* (**Ramadan et Mörsel, 2002**).

Constituants phospholipidiques	% des PL
phosphatidyl choline	46
Phosphatidyl ethanolamine	25
Phosphatidyl serine	12
phosphatidyl inositol	9,56
lysophosphatidyl choline	4,23
Phosphatidyl glycerol	1,51
Lysophosphatidyl ethanolamine	1,2

Une étude complémentaire sur les glycolipides de *Nigella sativa* a permis de séparer et d'identifier six composés dont le plus abondant est le digalactosyl diacyl glycérol qui forme 55,6% des glycolipides totaux (**Ramadan et Mörsel, 2003**).

L'analyse phytochimiques de deux variétés des graines *N. sativa* (provenant d'Iran et de Tunisie) montre que le principal acide gras insaturé est l'acide linoléique suivi par l'acide oléique, alors que l'acide gras saturé majoritaire est l'acide palmitique.

La présence d'autres acides gras ; myristoleique, palmitoleique, margarique, arachidique, eicosenoïque, behénique, lignocérique à été également détectée (**Nickavar et al., 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007**).

Tableau N°04: Composition en acides gras des graines de *Nigella sativa* d'Arabie (Al-Jassir, 1992).

ACIDES GRAS	% des AG
acide myristique C 14:0	0,90 ± 0,08
acide myristoléique C 14:1	0,18 ± 0,03
acide palmitique C 16:0	11,90 ± 0,18
acide palmitoléique C 16:1	0,30 ± 0,01
acide stéarique C 18:0	2,28 ± 0,11
acide oléique C 18:1	23,58 ± 1,03
acide linoléique C 18:2	59,34 ± 1,96
acide arachidonique C 20:0	0,14 ± 0,02
acide linoléinique C 18:3	0,30 ± 0,12
acide éicosadiénoïque C 20:2	—
acide lignocérique C 24:0	1,080 ± 0,012
acides gras saturés	16,30
acides gras insaturés	83,70

Ultérieurement **Cheikh-Rouhou et al (2008)** ont mis en évidence la richesse de l'huile de la Nigelle en stérols (17,41-42,66% de la matière insaponifiable), dont le β -sitostérol est le plus abondant (44-54%), suivi par le stigmastérol (16.57–20.92%), Δ 7-stigmasterol, Δ 7-avenasterol et le cholestérol qui sont également détectés mais à des taux plus faibles.

II.2.2.L'huile essentielle

L'huile essentielle représente entre 1,4–1,9% du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50% du poids des graines (**Benkaciet al., 2006**).

L'analyse de cette 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 regroupés dans le tableau n° 5 ;

Tableau N° 05 : Les composés de monoterpènes d'huile essentielle de *Nigella sativa* (**Burits et Bucar, 2000**).

composants de monoterpènes	Pourcentages
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
t-anethol	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 *N. 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 CPG-SM (*Chromatographie en phase gazeuse – Spectroscopie de Masse*), 112 composés ont été identifiés et caractérisés, le p-cymène représente toujours le composé le plus abondant suivi de la thymoquinone (**Benkaci et al., 2007**).

II.3.Composés aromatiques

Il a été considéré que la plupart des activités 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 El-Dakhakhny, 1960**).

C'est en 1963 que la thymoquinone, monoterpène oxygéné, a été isolée dans l'huile de nigelle, par El-Dakhakhny, et d'autres études ont mis en évidence les principaux constituants (**Canonica et al., 1963**).

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

La présence de thymohydroquinone, de thymol, de produits d'oxydation de la thymoquinone, comme la dithymoquinone sont signalés dans la figure n° 5 ;

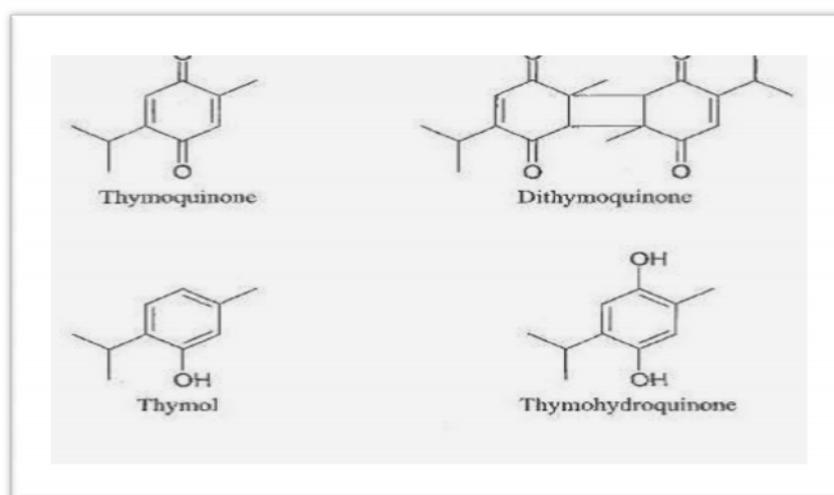


Figure N° 05 : Représentation chimique de la thymoquinone et de ses dérivés retrouvés dans l'huile essentielle de *N. sativa* L., d'après (**Cihan Toparlan, 2012**).

II.4. Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes. Ce sont des composés très répandus dans le règne végétal. Solubles dans l'eau, ils libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine (sapogénine) (**Greenish, 1880**).

Dans une étude réalisée par **Kumara et al (2001)** il a été possible d'isoler et de caractériser à partir des graines de *Nigella sativa* une saponoside triterpénique douée de propriétés antitumorales appelée l' α -hederine.

Une étude ultérieure de **Taskin et al (2005)** a permis d'isoler à partir de l'extrait méthanolique trois autres saponosides apparentées à l' α -hederine, avec l'élucidation de leurs structures par des méthodes chimiques et spectrales :

- 3-O- β -D-xyl (1-3)- α -L-rha-(1-2)- α -L-ara-28-O- α -L-rha (1-4)- β -D-glu(1-6)- β -D-glu-hédéragénine ;
- 3-O- α -L-rha-(1-2)- α -L-ara-28-O- α -L-rha(1-4)- β -D-glu(1-6)- β -D-glu-hédéragénine
- 3-O- β -D-xyl (1-3)- α -L-rha-(1-2)- α -L-ara-hédéragénine.

II.5. Polyphénols et flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés aromatiques dont la biosynthèse constitue l'un des processus fondamentaux de la phytochimie. Ils font partie de ce que l'on appelle les composés phénoliques. Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. Les Renonculacées sont un groupe riche en flavonols et en flavones.

Trois flavonoïdes triglycosylés (figure n°6) ont été isolés à partir des graines de *Nigella sativa* et leurs structures ont été déterminées (**Merfort et al., 1997**) :

- 1) quercétine 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.
- 2) kœmpférol 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.
- 3) quercétine 3-(6-feruloglucosyl) (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.

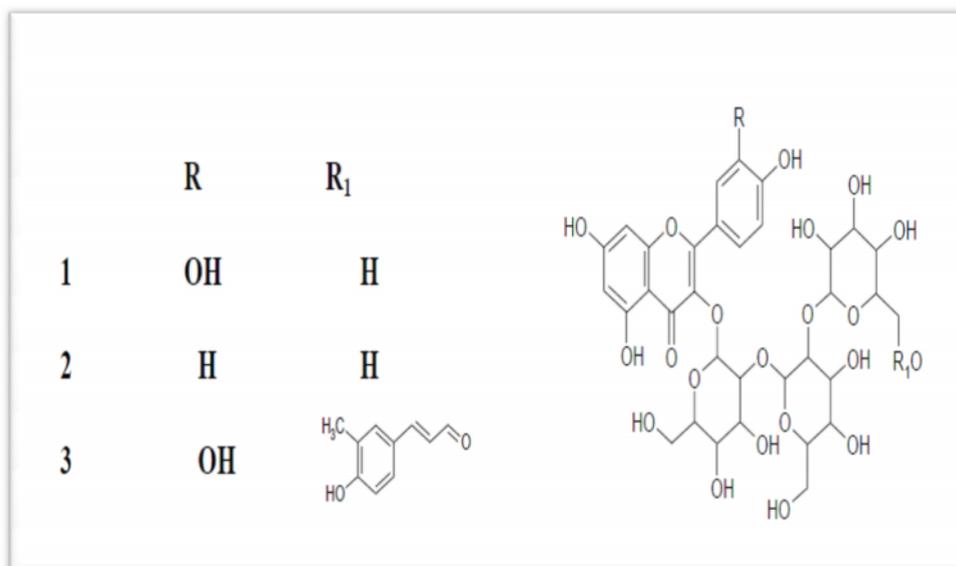


Figure N°06 : Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de *Nigella sativa* L., d'après (Merfort *et al.*, 1997).

En 2008, quatorze composés phénoliques ont été isolés à partir d'un extrait méthanolique de pousses et de racines de *N. sativa*. Ceux-ci sont : l'acide gallique, l'acide *para*-hydroxybenzoïque, l'acide chlorogénique, l'acide vanillique, l'acide *para*-coumarique, l'acide férulique, l'acide *trans*-2-hydroxycinnamique, l'acide *trans*-hydroxycinnamique, l'épicatéchine, la catéchine, la quercétine, l'apigénine, l'amentoflavone et la flavone.

II.6. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances présentant un caractère alcalin, contenant de l'azote, le plus souvent inclus dans un hétérocycle. Les alcaloïdes ont, pour la plupart, des actions physiologiques et thérapeutiques à faibles doses. Ils deviennent cependant très toxiques à fortes doses.

Les graines de *N. sativa* contiennent également des alcaloïdes :

- nigellicine (Atta *et al.*, 1985a) et nigellidine, ayant un noyau indazol (Atta *et al.*, 1995),
- l'isoquinone nigellimine (Atta *et al.*, 1992) et son N-oxyde (Atta *et al.*, 1985b),
- les alcaloïdes diterpènes Dollabllane-types nigellamines A₁, A₂, B₁, B₂ (Morikawa *et al.*, 2004a), A₃, A₄, A₅, et C (Morikawa *et al.*, 2004b).

Les principaux alcaloïdes de *N. sativa* sont représentés dans la figure n°7 ;

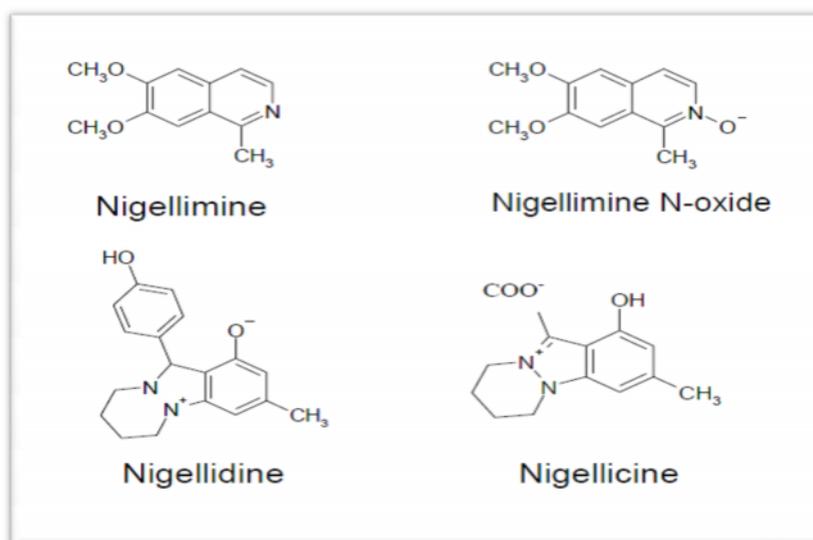


Figure N° 07 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de *N. sativa* L., d'après (Atta *et al.*, 1985a).

II. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DES GRAINES DE *NIGELLA SATIVA*

Ces dernières années, les graines de *N. sativa* ont été soumises à une gamme d'investigations pharmacologiques. Ces études ont montré une gamme étendue d'activités telles que ; l'activité antibactérienne, anti-tumoral, anti-inflammatoire, dépresseur de CNS et analgésique, hypoglycémiques, relaxant musculaire lisse, cytotoxique et immunostimulant. Certaines de ces activités ont été principalement attribuées aux huiles fixes et volatiles (Nickavar *et al.*, 2003).

III.1. Activité antioxydante

Parmi les différents travaux qui ont été effectués pour évaluer les effets des graines de *Nigella sativa*, la majorité d'entre eux sont focalisés sur ses propriétés antioxydants *in vitro* et *in vivo*.

III.1.1. Activité antioxydante *in vitro*

L'huile essentielle de *Nigella sativa*, ainsi que ses fractions, ont été testées pour leur activité antioxydante par une évaluation rapide des antioxydants en utilisant deux méthodes de CCM de criblage. La thymoquinone, le carvacrol, le t-anthenol, et le 4-

terpineol ont montré une propriété scavenger des radicaux libres remarquable. Cette propriété antioxydante a été confirmée par d'autres tests [Essai du DPPH (Diphénylpicrylhydrazyl), peroxydation lipidique non enzymatique et l'essai du désoxyribose] (**Burits et Bucar, 2000**).

L'huile fixe et ses fractions (lipides neutres, glycolipides et phospholipide) ont montré une activité antioxydante vis-à-vis des deux radicaux libres stables (DPPH et le radical glavinoxyl). Cette activité antioxydante est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile (**Ramadan et Mörsel, 2003**). L'huile fixe de *Nigella sativa* ainsi que la thymoquinone (un des composé majoritaire de l'huile essentielle) inhibent la peroxydation lipidique non enzymatique dans les liposomes (**Houghton et al., 1995**).

A coté de l'huile, qui a été largement étudiée pour ses propriétés antioxydantes, les extraits éthanolique et aqueux des graines de *Nigella sativa* délipidées ont présenté une activité anti-oxydante importante, comparable à celle du TBHQ (*tert*-butyl hydroquinone) (**Atta et Imaizumi, 1998**).

Thippeswamy et Akhilender (2005) ont investigué les propriétés antioxydantes de trois variétés de cumin dont *Nigella sativa*. L'extrait aqueux et méthanolique de ses graines ont montré une activité antioxydante dans trois systèmes ; effet scavenger du radical DPPH, effet scavenger des hydroperoxydes lipidiques et inhibition de la peroxydation lipidique lipooxygénase dépendante, inhibition de la peroxydation lipidique non enzymatique au niveau des microsomes hépatiques.

La pré incubation des macrophages péritonéales avec l'extrait aqueux ou les fractions décoctées des graines de *Nigella sativa* cause une diminution dose dépendante de la production du NO après activation par les LPS (Lipopolysaccharide) d'E. coli (**Mahmood et al., 2003**).

La thymoquinone induit une protection significative des hépatocytes en culture contre la toxicité induite par le *tert*-Butyl hydroperoxide (**Daba et Abdel-Rahman., 1998**). De plus, la thymoquinone réduit la production du nitrite (un paramètre de la synthèse du NO) et diminue l'expression des gènes ainsi que la biosynthèse de la iNOS (nitrique oxyde synthase inductible) dans le surnageant des macrophage stimulés par les LPS sans affecter la viabilité cellulaire (**El-Mahmoudy et al., 2002**).

La thymoquinone montre un effet scavenger de l'anion superoxyde généré photochimiquement, biochimiquement, ou suite à une stimulation des neutrophiles par les ionophores calciques (Nagi et Mansour, 2000).

III.1.2. Activité antioxydante *in vivo*

L'administration de l'huile de *Nigella sativa* et de la thymoquinone chez des rats protège contre l'hyper homocystéinémie induite par la méthionine en bloquant l'accumulation de l'homocystéine, l'une des causes de l'état du stress oxydant, conduisant à la protection contre la peroxydation lipidique et les changements du statut oxydatif (El-Saleh *et al.*, 2004). Ainsi, une amélioration de l'activité du système antioxydant et une protection contre la peroxydation des lipides et l'endommagement hépatique ont été observés chez des lapins avec diabète mellitus induit par l'alloxane, après traitement par l'extrait aqueux des graines de *Nigella sativa* (Meral *et al.*, 2001). Les investigations d'autres chercheurs ont prouvé que le prétraitement des rats exposés à des radiations ionisantes par l'huile essentielle de *Nigella sativa* provoque une réduction significative des marqueurs du stress oxydant (MDA, nitrate et nitrite) avec une augmentation considérable du taux des antioxydants non enzymatiques (acide ascorbique, rétinol, GSH) (Cemek *et al.*, 2006).

Par ailleurs, le traitement des rats soumis à un régime alimentaire contaminé par l'aflatoxine, avec l'huile de *Nigella sativa* entraîne une protection importante contre l'hépatone phrotoxicité et les endommagements oxydatifs (réduction des taux de la GPx, la SOD, augmentation de la peroxydation lipidique et des altérations de l'ADN) induits durant l'aflatoxicose. Cet effet protecteur de l'huile de *Nigella sativa* est probablement attribué à leur activité radical scavenger (Abdel-Wahhabet Aly, 2005).

III.2. Effets sur le système immunitaire

Les graines de *Nigella sativa* présentent *in vitro* des propriétés immunopotentialisatrices des lymphocytes T humains (El-Kadi *et al.*, 1987). Confirmées par Haq *et al.* (1995), qui ont montré que les graines activent la sécrétion d'IL-3 et augmente la production d'IL-1 β par les lymphocytes T, ce qui indique un effet stimulateur sur les macrophages, soit direct ou via IL-1 β .

Des études ultérieures conduites par les mêmes auteurs, ont montré que les protéines isolées de la graine entière sont responsable d'effet stimulant sur la production de cytokine (TNF- α) ainsi que la prolifération des lymphocytes en culture. **Salem et Hussain (2000)** ont rapporté que *Nigella sativa* stimule également la production de l'INF- γ et la prolifération des macrophages et des lymphocytes T₄ *in vivo*.

Ces résultats sont en concordance avec les travaux de **Swamy et Tan (2000)**, qui ont montré, qu'en présence de doses optimales de mitogènes, l'extrait d'acétate d'éthyle possède un effet cytotoxique très important sur différentes cellules cancéreuses qui est accompagné d'une potentialisation significative de la réponse immune, mais dont le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé.

D'autre part, la plupart des sujets qui ont été traités par l'huile de *Nigella sativa* pendant quatre semaines ont montré une augmentation de 55% des cellules CD4 et CD8, et 30% des cellules naturel killer (NK) (**Salem, 2005**).

Nigella sativa a été traditionnellement utilisée dans le traitement des maladies allergiques. Cette action ne fait pas intervenir les cellules LTh1 et LTh2 en réponse à un stimuli allergique (**Büyükoztürk et al., 2005**). D'autres voies peuvent être impliquées comme l'inhibition de la libération d'histamine des mastocytes activés par diminution du taux du calcium intracellulaire et inhibition de la protéine kinase C (**Chakravarty, 1993**).

III.3. Effets anti-inflammatoire et analgésique

Plusieurs auteurs ont étudié l'éventuelle activité analgésique et anti-inflammatoire d'extraits ou de composés purs issus de *Nigella sativa*. **Khanna et al (1993)** ont montré que l'huile fixe de *Nigella sativa* possède une importante action antinociceptive qui est dûe à la présence d'un principe opioïde. Cette action est antagonisée par la naloxone. Des études plus approfondies ont démontré que l'action antinociceptive peut être également engendrée par la thymoquinone aussi bien que l'huile fixe par activation indirecte des récepteurs super spinaux μ et κ (**Abdel-Fattah et al., 2000 ; Ali et Blunden, 2003**).

Selon **Ghannadi et al (2005)** les polyphénols de *Nigella sativa* disposent de propriétés anti-inflammatoires chez le rat et la souris dans le test de l'oedème de la pâte induit par le carragénane, et montre des propriétés analgésiques dans le test de la fomaline et de l'acide acétique. Le mécanisme par lequel l'huile fixe de *Nigella sativa*

et la thymoquinone exercent leurs effets anti-inflammatoires a été étudié, la thymoquinone est avérée être un puissant inhibiteur de la synthèse des eicosanoïdes notamment la thromboxane B₂ et leucotriène B₄ par l'inhibition respective des cyclooxygénase et lipoxygénase. Cependant, l'activité de l'huile fixe sur ces deux enzymes est plus importante que la thymoquinone elle-même ; l'activité anti-inflammatoire n'est pas donc entièrement due à la présence de la thymoquinone ; des acides gras insaturés de type C₂₀:2 semblent être impliqués (**Houghton et al., 1995 ; Gilani et al., 2004**).

III.4. Activité anti-microbienne

Les différents extraits des graines de *Nigella sativa* présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes. L'huile essentielle même diluée à 1%, la dithymoquinone ainsi que l'extrait méthanolique exercent une importante activité antimicrobienne sur des germes Gram positif et Gram négatif, (**Agrawal et al., 1979 ; Aljabre et al., 2005**). L'huile de la Nigelle possède également un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes* (**Nair et al., 2005**).

Différents extraits bruts issus de la graine ont été testés vis-à-vis de germes antibiorésistant (16 Gram négatifs et 6 Gram positifs), les alcaloïdes totaux et le décocté se sont révélés être les extraits les plus actifs, notamment à l'égard des bactéries à gramme positif (**Morsi, 2000**). De même, L'extrait méthanolique et hexanique possèdent aussi un effet inhibiteur très considérable sur *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Mashhadian et Rakhshandeh, 2005**).

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 de dermatophytes (**Aljabre et al., 2005**).

En plus des activités antibactériennes et antifongiques, l'huile de *Nigella sativa* possède aussi un effet antiviral vis-à-vis de virus de l'herpès : cytomégalo virus murin (MCMV) (**Salem, 2005**), des propriétés anti-cestodales et anti-nématiques comparables à celles de la pipérazine (antiparasitaire) (**Agrawal et al., 1979**).

III.5. Effets anticancéreux et antimutagène

L'activité anti-tumorale des extraits ou de composés isolés de *Nigella sativa* a été testée par plusieurs auteurs. L'extrait méthanolique brut préparé à partir des graines de *Nigella sativa* présente une importante action cytotoxique sur le carcinome ascitique d'Ehrlich et sur le lymphome ascitique de Dalton tout en exerçant une cytotoxicité³¹ minimale vis-à-vis des lymphocytes normaux (Musa *et al.*, 2004 ; Ghedira, 2006).

L'extrait décocté des graines de *Nigella sativa* exerce une forte activité cytotoxique sur les cellules hépatiques cancéreuses, notamment sur la synthèse d'ADN (Thabrew *et al.*, 2005).

Selon (Iddamaldeniya *et al.*, 2003) Le traitement des souris atteintes d'un cancer hépatique initié par diéthyl nitrosamine (DEN), avec le décocté des graines de *Nigella sativa* pendant 10 semaines, réduit significativement le nombre de cellules atteinte/cm², ce qui indique que cet extrait a un effet protecteur contre ces cancers hépatiques induits par le DEN. Différents extraits de *Nigella sativa*; l'huile essentielle, l'extrait d'acétate éthyle et celui du butanol, ont été testés sur différents tissus cancéreux (murine mastocytoma, kidneycarcinoma, sheepheartcarcinoma).

L'huile essentielle a montré un effet cytotoxique le plus important sur les trois lignées cellulaires suivi de l'extrait d'acétate éthyle, alors que celui du butanol présente un effet moindre (Ait-Mbarek *et al.*, 2007).

D'autre part, L'huile essentielle de *Nigella sativa* est capable d'inhiber la carcinogenèse du colon au stade post initiation chez la souris traitée par voie orale sans effets secondaires, cette inhibition est associée à la suppression de la prolifération cellulaire dans la muqueuse du colon (Salim et Fukushima, 2003).

In vitro, la thymoquinone et la dithymoquinone sont très cytotoxiques contre différentes lignées de cellules tumorales humaines : adénocarcinome pancréatique, sarcome utérine et la leucémie. Ils provoquent l'apoptose en bloquant le cycle cellulaire en phase G1, en augmentant le temps d'expression de p53 et en inhibant la protéine anti-apoptique Bcl-2 en même temps (Salem, 2005).

Les graines de *Nigella sativa* ou ses constituants présentent une action préventive des cancers et/ou réductrice de la cytotoxicité des médicaments antinéoplasiques usuels. En effet, la thymoquinone exerce *in vitro* et *in vivo* un effet inhibiteur de la carcinogenèse de l'estomac et du fibrosarcome induit par 20-méthyl cholanthrène chez la souris (Badary *et al.*, 1999 ; Badary et Gamal, 2001). Par ailleurs,

Kumara et Huat (2001) ont montré que l' α -hederine exerce d'importantes propriétés antitumorales chez la souris présentant un sarcome du poumon de Lewis ou la leucémie murine P388. De même, l'huile des graines de *Nigella sativa* réduit le potentiel fibrinolytique des cellules tumorales lié à leur phénotype de malignité. Cette action conduit à l'inhibition des invasions tumorales locales et de la métastase (**Awad, 2005**).

III.6. Effets sur le système gastro-intestinal

Les graines de *Nigella sativa* sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des désordres gastro-intestinaux, L'extrait aqueux des graines réduit de 36% l'indice d'ulcère induit par l'acide acetyl salicylique (aspirine) et diminue l'activité peptique et la production d'acide chez le rat (**Ghedira, 2006**).

Il a été démontré que l'administration de L'huile fixe à raison de 0.88g/kg/jours pendant deux semaines augmente la mucine gastrique et le contenu en glutathion et avec diminution du taux de l'histamine, sans affecter l'acidité libre ni le suc gastrique (**El-Dakhakhny et al., 2000**). Cette huile ainsi que la thymoquinone protègent contre les lésions gastriques, induites par le processus d'ischémie-réperfusion, grâce à leur pouvoir anti-radicalaire (**El-Abhar et al., 2003**).

L'extrait alcoolique des graines de *Nigella sativa* présente également une activité anti-ulcéreuse qui a été attribuée aux flavonoïdes qu'il contient (**Raj Kapoor et al., 2002**). De même, l'extrait méthanolique montre un effet spasmolytique ce qui confirme l'utilisation traditionnelle de la Nigelle dans le traitement des diarrhées (**Gilani et al., 2004**).

III.7. Effets sur le système respiratoire

Les propriétés anti-tussives et antiasthmatiques des graines de *N. sativa* sont bien reconnues depuis des siècles, faisant d'elle une des plantes les plus recommandées pour le traitement des maladies respiratoire.

D'après (**El Tahir et al., 1993**) l'administration intraveineuse des huiles essentielles de *N. sativa* est responsable d'une augmentation dose dépendante du quotidien respiratoire et de la pression intra trachéal chez le cobaye.

L'extrait brut méthanolique des graines de *N. sativa* a un effet spasmolytique et broncho-dilatateur avec implication probable de bloqueurs des canaux calciques (**Gilani et al., 2001**). Cette activité est concentrée dans la fraction organique qui est

dix fois supérieure à celle de l'extrait brut. Le traitement des cobayes préalablement exposés à des aérosols de l'acide citrique par différents extraits de *Nigella sativa* (extrait aqueux, extrait macéré et extrait décocté) montre un effet antitussif très important comparable à celui de la codéine (**Boskabady et al., 2004**).

Les investigations d'autres chercheurs ont permis de prouver que le Nigellone (polythymoquinone) est un agent protecteur efficace contre l'asthme et la bronchite, en inhibant efficacement la libération de l'histamine (**Gilani et al., 2004**).

L'action des graines de *Nigella sativa* sur le système respiratoire est probablement la résultante de plusieurs effets ; cholinergiques (**Boskabady et Shahabi, 1997**), inhibition des récepteurs H1 de l'histamine (**Boskabady et Shiravi, 2000**) et antagonisme du calcium (**Gilani et al., 2001 ; Boskabady et Shirmohammadi, 2002 ; Boskabady et al., 2004**).

III.8. Activité antidiabétique

Les effets de *Nigella sativa* sur certaines complications du diabète expérimental induit chez les animaux ont fait l'objet de nombreux travaux, **Al-Hader et al., (1993)** rapportent que l'huile essentielle de la graine administrée par voie intrapéritoneale (à raison de 50 mg/kg) abaisse de façon significative (de 15 à 23 %) la glycémie à jeun chez les animaux normo et hyperglycémiques. L'insulinémie n'ayant pas été affectée par les traitements. L'effet hypoglycémiant observé se manifeste selon un mécanisme non encore identifié n'impliquant pas l'insuline (**Hawsawi et al., 2001 ; El-Dakhakhny et al., 2002**). D'autres auteurs ont mis en évidence un effet hypoglycémiant via l'oxyde nitrique de la thymoquinone chez l'animal rendu diabétique par la streptozotocine (**El-mahmoudy et al., 2005**).

Le traitement des rats avec l'extrait de *Nigella sativa* seul ou combiné avec les hormones thyroïdiennes humaines a montré une augmentation de la production d'insuline par les cellules β du pancréas (**Altan et al., 2007**).

Les travaux menés par **Houcher et al (2007)** sont en concordance avec les études antérieures, ils ont montré que le traitement des rats diabétiques avec l'extrait brut et l'huile commerciale provoque une réduction importante de la glycémie de 58.09 et 73.27 %, respectivement. Le mécanisme d'action impliqué n'est pas relié à l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose ni à la stimulation de l'insulino

secrétion, mais il est probablement dû à l'inhibition des enzymes de la néoglucogenèse hépatique.

III.9. Autres actions biologiques de *N. sativa*

Plusieurs autres activités biologiques de *N. sativa* ont été rapportées dans la littérature. La liste suivante en cite la majeure partie :

- Activité chronotrope négative.
- Activité anti-nématodes.
- Inhibition de plaque dentaire.
- Inhibition de la formation de l'aflatoxine.
- Activité analgésique, Activité hémostatique.
- Activité neuroleptique.
- Protection contre la fibrose et la cirrhose du foie, Protection contre l'ulcère.
- Activité anti-oxydante.

En plus de son action hypoglycémiante, la nigelle possède d'autres propriétés bénéfiques sur la plupart des désordres métaboliques et anomalies associés au diabète de type II, notamment son action anti hypertensive, sa capacité à contrôler le poids corporel et son pouvoir de régler l'hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie. On peut donc conclure que cette plante possède un potentiel thérapeutique prometteur **(Benhadou Andaloussi, 2009)**.

Ces deux études ont été réalisées au laboratoire de recherche et au laboratoire de Microbiologie alimentaire du département de biologie de la faculté des Sciences de l'Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Notre travail expérimental a porté sur l'identification des composants chimiques qui peuvent être responsables des propriétés antimicrobiennes de l'huile de nigelle, et d'évaluer l'activité antibactérienne et antifongique de cette huile et celle de Coloquinte sur dix souches microbiennes dont le but de déterminer une synergie entre ces deux huiles végétales.

La nature et l'origine des deux huiles et des souches utilisées sont indiquées dans le **Tableau N° 6**.

I. Matériel

I.1. Matériels biologique

Tableau N° 06 : Nature et origine du matériel biologique utilisé.

	Nature	Origine
Huiles	<ul style="list-style-type: none">➤ Nigelle « <i>Nigella sativa</i> »➤ Coloquinte « <i>Citrullus colocynthis</i> »	<ul style="list-style-type: none">➤ Les huiles végétales ont été fournies par le laboratoire de produits naturels (LAPRONA) Université de Tlemcen.➤ Ces huiles ont été stockées à +4°C à l'obscurité.

Espèces Bactériennes	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Escherichia coli</i> ATCC* 25922 ➤ <i>Salmonella thyphimurium</i> ATCC 13311 ➤ <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 ➤ <i>Klebseilla pneumoniae</i> ATCC 700603 ➤ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ➤ <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659 ➤ <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 43452 ➤ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ➤ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10879 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ les dix souches utilisées sont des souches de référence provenant de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).
Souche de Levure	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 	

* ATCC : Américain Type of Culture Collection.

I.2. Milieux de cultures et solutions de dilutions (Annexes)

- Gélose nutritive.
- Gélose Mac Conkey.
- Gélose Hektoen.
- Gélose Chapman.
- Gélose au cétrimide.
- Gélose Mossel.
- Gélose B E A (gélose bile-esculine-agar).
- Gélose Mueller-Hinton.
- Gélose Sabouraud.
- Bouillon cœur cerveau (BHIB).
- Bouillon nutritif.
- Bouillon Mueller-Hinton.
- Bouillon Sabouraud.
- Eau physiologique.

I.3. Produits chimiques et matériaux

- 1) Le méthanol CH₃OH de catégorie HPLC.
- 2) Le 2-propanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) a été utilisé.
 - a) L'eau filtrée a été obtenue en passant l'eau dans un système Millipore (Direct-Q3).

- b) L'huile fixe de nigelle a été obtenue par extraction de la poudre des graines de *Nigella sativa* par l'appareil Soxhlet, en utilisant un solvant organique apolaire (hexane / éther de pétrole).

I.4. Appareillage

Un Système de chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) de model YL9100 a été utilisé.

- ❖ Notre appareil d' HPLC est Composé de;
 - Réservoirs de solvants (phase mobile).
 - Dégazeur (évite les bulles d'air) de model YL9101.
 - Système d'injection.
 - Pompe de model YL9110.
 - Détecteur UV de model YL9120.

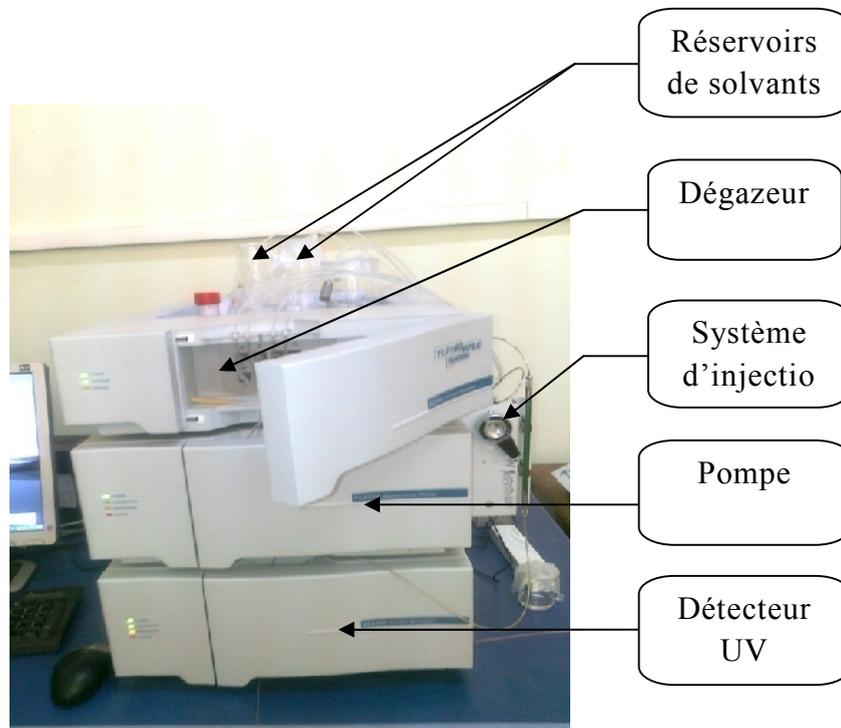


Figure N° 08 : Photo personnelle; Appareil d'HPLC.

- ❖ Le système d'HPLC est équipé d'un enregistreur et d'une imprimante.



Figure N° 09 : Photo personnelle; Système d'HPLC.

I.5. Colonne

- ❖ Une colonne d'HPLC C18 125 apolaire en silice (150 mm x 4,6 mm, dimension particulaire 5 μ m), de model S/N H10-065 a été employée.

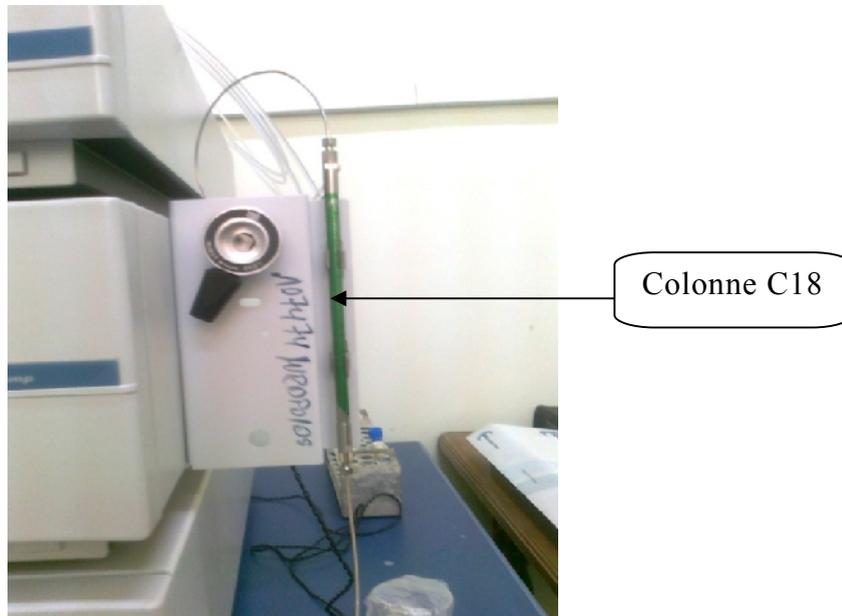


Figure N° 10 : Photo personnelle; Colonne d'HPLC C18 125.

II. Méthodes

II.1. Méthode de l'analyse d'HPLC

Cette analyse d'HPLC a été entreprise pour obtenir des informations sur la composition en quinones d'huile de graines de *Nigella sativa*.

Il s'agit de déterminer qualitativement et quantitativement les quatre constituants de l'huile de nigelle à savoir : la thymoquinone (TQ), dithymoquinone (DTQ), thymohydroquinone (THQ), et thymol (THY).

II.1.1. Conditions chromatographiques

Les différentes conditions chromatographiques utilisés dans notre analyse d'HPLC d'huile de nigelle, sont mentionnées dans le tableau N° 7.

Tableau N° 07 : Les conditions chromatographiques utilisés.

Conditions chromatographiques	
Phase stationnaire	➤ Colonne d'HPLC type silice greffé C18 (125) apolaire (150 x 4,6 mm, dimension particulaire 5 µm).
Phase mobile	➤ L'eau filtrée : méthanol : 2-propanol (50x2 : 45 x 2 : 5 x 2 % v /v), à un débit de 1 ml /min.
Débit de phase mobile	➤ 1 ml /min.
Echantillon injecté	➤ 20 µl d'huile de nigelle filtrée.

Détections UV	<ul style="list-style-type: none">➤ 294 nm pour le THQ.➤ 254 nm pour le TQ, DTQ, et THY.
Nombre de pompes utilisés	<ul style="list-style-type: none">➤ Une seule pompe.
Température d'injecteur	<ul style="list-style-type: none">➤ Systématique à 35C°.
Température de colonne	<ul style="list-style-type: none">➤ /
Température du détecteur	<ul style="list-style-type: none">➤ /
Temps limites de détections	<ul style="list-style-type: none">➤ 25 min pour le THQ.➤ 30 min pour le TQ, DTQ, et THY.

II.1.2. Mode opératoire

II.1.2.1. préparation de l'échantillon d'huile de nigelle

L'échantillon d'huile brute des graines de *Nigella sativa* a été filtré, on appliquant un Microfiltre MILLIPORE (0,2 µm, unité de filtration 5 bars).

A l'aide d'une seringue, On exerce une pression de 5 bars sur l'échantillon d'huile, 5 min après l'échantillon d'huile a été purifié de ses impuretés.

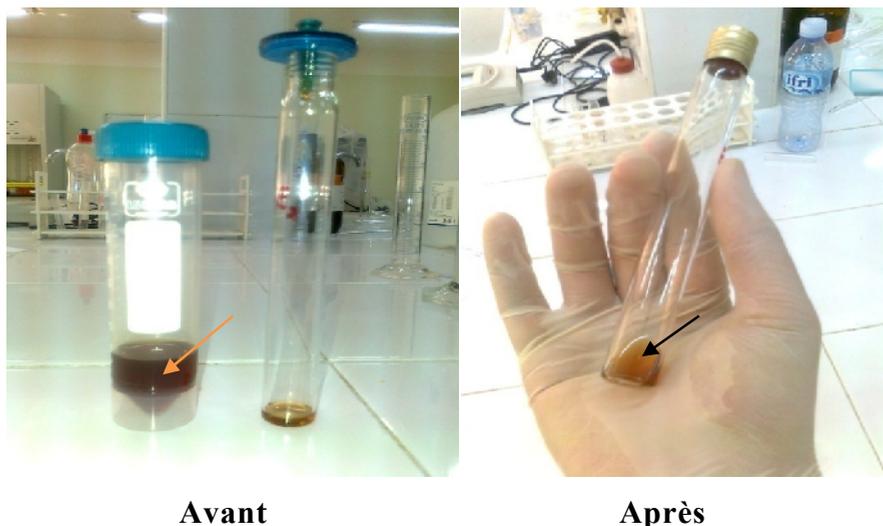


Figure N° 11 : Photo personnelle; Filtration de l'échantillon d'huile de nigelle.

II.1.2.2. Préparation de la phase mobile

Après avoir filtré l'eau par un système Millipore. Nous avons versé 100ml de cette eau ultra pure dans une éprouvette graduée.

Dans une autre éprouvette graduée nous avons mis 90ml de méthanol, puis à l'aide d'une pipette nous avons ajouté 10ml de 2-propanol ensuite, nous avons mis l'ensemble des trois solvants (l'eau filtrée, méthanol, 2-propanol) 200 ml dans un flacon que nous avons agité pour obtenir un solvant homogène de phase mobile.

La phase mobile de 200ml a été répartie comme le suivent ; 100ml a été utilisé dans le premier test pour la détection du composant Thymohydroquinone (THQ), et le reste a été utilisé dans le deuxième test pour la détection des composants Thymoquinone (TQ), Dithymoquinone (DTQ), et Thymol (THY).

Enfin, nous avons placé ce flacon dans le réservoir de l'appareil d'HPLC.

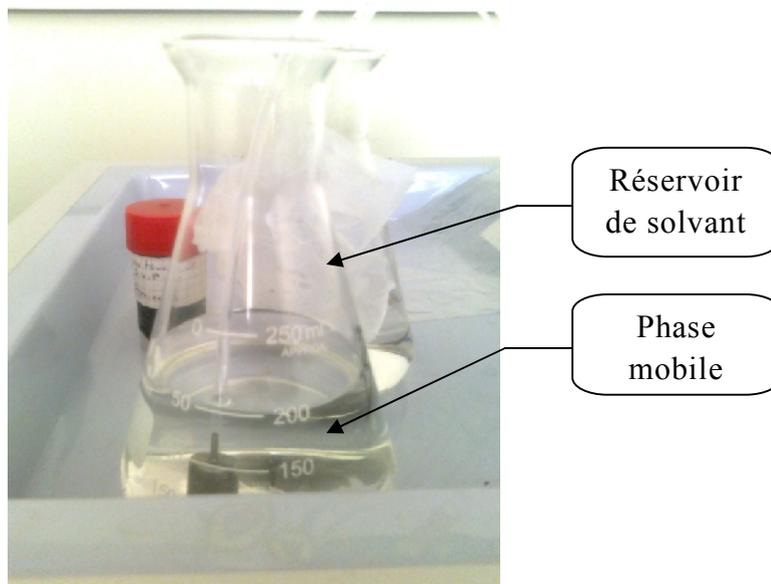


Figure N° 12 : Photo personnelle; Phase mobile utilisée
(Eau filtrée, méthanol, 2-propanol).

II.1.2.3. Mise en marche du système d'HPLC

❖ Test N° 01 : détection du composant Thymohydroquinone (THQ)

Après avoir allumé le système d'HPLC, nous avons placé un piston de la pompe au fond du réservoir de La phase mobile.

Puis à l'aide du logiciel YL Clarity de l'appareil d'HPLC nous avons inséré les conditions chromatographiques suivantes:

- 1) Nombre de pompes utilisées : 1
- 2) Type de colonne (PS) : C18 125
- 3) phase mobile utilisée : méthanol /Eau /2-propanol
- 4) Débit de la phase mobile : 1 ml /min
- 5) Volume d'échantillon éjecté : 20 μ l
- 6) Detection UV: 294 nm
- 7) Temps limite de détection : 25 min

On utilisant une seringue d'HPLC, nous avons extrait 20 μ l d'huile filtrée de nigelle que nous avons mise dans le dispositif d'injection de l'appareil d'HPLC (**chargé puis injecté**).

a) Chargement (remplissage)

Nous avons introduit l'aiguille de la seringue dans le septum du dispositif d'injection.

Puis nous avons rempli la boucle avec l'échantillon contenu dans cette seringue dont le trop plein a été rejeté vers l'extérieur.

Pendant cette étape, la phase mobile circule en permanence sur la colonne
Poussée par la pompe sous haute pression.

A ce stade, la seringue est retirée du dispositif d'injection.

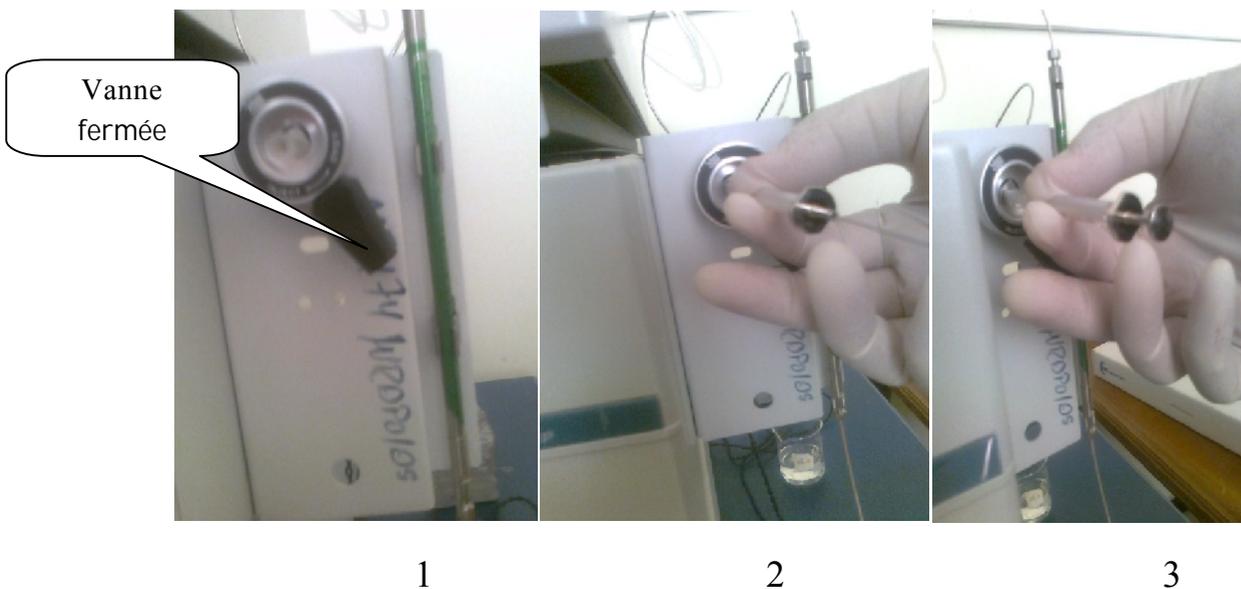


Figure N° 13 : Photos personnelles; Phase de chargement de la boucle.

b) Injection de l'échantillon

Le contenu de la boucle est injecté, en tournant la vanne d'injection (figure n° 15), la phase mobile est mise en contact avec la boucle et la colonne.

Au cours de cette étape, l'échantillon est véhiculé sur le système chromatographique à l'aide de la phase mobile.

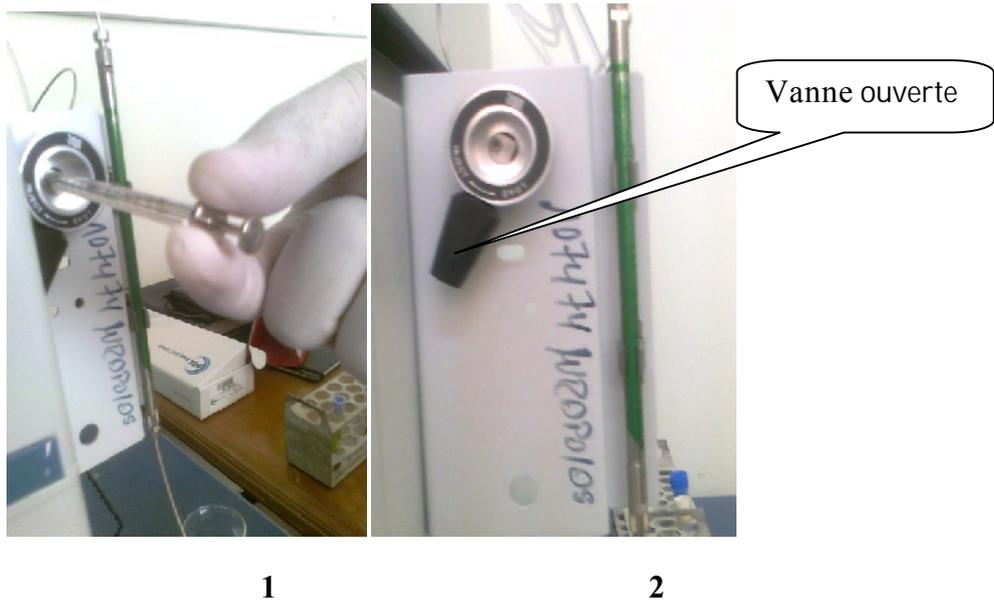


Figure N° 14 : Photos personnelles; Phase d'injection de l'échantillon.



Figure N° 15 : Photo personnelle; vanne d'injection fermée.

- On patiente pendant 25 min pour l'analyse d'HPLC.
- A leurs sorties de la colonne et grâce au détecteur UV les différents solutés de l'échantillon sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.
- A la fin du temps de détection, on obtient un chromatogramme complet.

- A l'aide de notre logiciel, nous avons modifié le chromatogramme, en supprimant les bruits de fond.
 - Puis nous avons limité chaque pic principal avec deux traits, pour permettre au logiciel de mesurer les surfaces et les hauteurs de ces derniers.
 - Enfin on ferme la vanne d'injection et on imprime les résultats de l'analyse d'HPLC.
- ❖ **Test N° 02 : détections des composants Thymoquinone (TQ), Dithymoquinone (DTQ), et Thymol (THY)**

Dans cette analyse d'HPLC nous avons changé la longueur d'onde UV à 254 nm et le temps limite de détection à 30 min. et en a répété les mêmes étapes ci-dessus.

II.1.3. Analyses qualitatives et quantitatives

II .1.3.1. La recherche des composants

Les pics sont identifiés par la comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des solutés de référence (étalons), ou une base de données comme *scanview* 2011 qui édite les résultats des travaux de l'analyse d'HPLC sur différents composants chimiques.

Remarque :

Puisque les étalons de quinones n'ont pas été disponible, nous avons effectué la recherche des composants; thymoquinone, dithymoquinone, thymohydroquinone, et le thymol, de l'huile des graines de *Nigella sativa*. on se référant aux travaux de (Ghosheh *et al.*, 1999).

II.1.3.2. La quantification des composants

La quantification des composés est obtenue directement à partir des surfaces des pics des solutions de référence, puis exprimés en pourcentages par le logiciel YL Clarity.

Pour quantifier la teneur des composés, on effectue une courbe d'étalonnage à partir des solutions standards de l'étalon mère).

Remarque :

Etant donné que les étalons de quinones n'ont pas été disponibles, nous avons exploité les teneurs de quinones mesurés par **Ghosheh et al., (1999)**, dans une huile des graines de *Nigella sativa* commercialisée en Egypte.

II.2. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne

II.2.1. Isolement et purification

En respectant les conditions d'asepsie, et dans le but de revivifier nos souches de référence, nous avons effectué le repiquage des souches bactériennes à partir d'une culture conservée sur Gélose nutritive inclinée (GNI) et d'une Gélose Sabouraud inclinée dans le cas de *Candida albicans*.

Ces neuf souches bactériennes, ont été ensemencées séparément dans 5 ml de BN, et incubées à 37°C / 24h. Pour *Candida albicans* le bouillon Sabouraud a été utilisé, et l'incubation a été faite à 37°C / 48h.

Ensuite, de chaque tube incubé, nous avons ensemencé par technique d'épuisement deux boîtes de Pétri préalablement coulées contenant le milieu spécifique pour chaque souche, puis nous les avons incubées à 37°C / 24h.

Les différents milieux utilisés pour la culture et l'isolement des différentes souches sont mentionnés dans le tableau N° 08.

Tableau N° 08 : Milieux de culture spécifiques pour l'isolement et la croissance des différentes souches de référence.

Souches	Milieux utilisés	
	Solide	Liquide
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Acinetobacter baumani</i> • <i>Klebseilla pneumoniae</i> • <i>Proteus mirabilis</i> 	Gélose Mac conkey	Bouillon nutritif
<i>Salmonella thyphimurium</i>	Gélose Hecktoen	Bouillon nutritif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose au cétrimide	Bouillon Mueller-hinton
<i>Enterococus faecalis</i>	Gélose B E A	Bouillon nutritif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gélose Chapman	Bouillon nutritif
<i>Bacillus cereus</i>	Gélose Mossel	Bouillon nutritif
<i>Candida albicans</i>	Gélose Sabouraud	Bouillon Sabouraud

Remarque :

Durant toute la période expérimentale, ces souches sont entretenues par repiquages successifs et conservées à +4°C.

II.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile de nigelle et l'huile de Coloquinte

II.2.2.1. Test de synergie de pouvoir antimicrobien des deux huiles végétales

Ce test nous permet d'évaluer simultanément l'activité antimicrobienne de l'huile de nigelle et l'huile de Coloquinte, et de détecter une éventuelle interaction entre ces deux huiles testées.

La technique comprend trois grandes étapes qui sont:

- Préparation de l'inoculum
- Ensemencement
- Dépôt de disques

II.2.2.1.1. Préparation de l'inoculum

Une ou deux colonies sont prélevées à partir de chaque souche et ensemencées dans 5ml de bouillon BHIB et incubées à 37°C/24h. Le repiquage de *C. albicans* a été réalisé sur bouillon Sabouraud.

À l'aide d'un colorimètre, la densité de l'inoculum des souches bactériennes est fixée entre 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 590 nm correspondant au standard 0,5 Mc Farland équivalent à 10^8 UFC/ml (**Aboun et al., 2001**).

- La densité de l'inoculum de nos souches bactériennes a été fixée entre 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 625 nm correspondant au standard 0,5 Mc Farland équivalent à 10^8 UFC/ml.

Concernant l'inoculum de *C. albicans* la densité finale est équivalente à 0,5 Mc Farland. (**Hacek et al., 1995**).

- La densité de notre inoculum de *C. albicans* a été fixée entre 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 530 nm correspondant au standard 0,5 Mc Farland équivalent à 10^8 UFC/ml.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture si la DO est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile si elle est trop forte.

II.2.2.1.2. Ensemencement

Après avoir coulé 20 ml de gélose Mueller Hinton dans neuf boîtes de Pétri, l'ensemencement a été fait par technique d'écouvillonnage en faisant un ensemencement par stries très serrées jusqu'à la moitié de la surface de gélose et on retournant la boîte de 180 degrés pour recommencer l'ensemencement du haut vers le milieu de la gélose.

- Concernant *C. albicans*, le test a été réalisé sur le milieu Sabouraud, et l'incubation a été faite à 37°C/ 48h.

II.2.2.1.3. Dépôt de disques

Dans le but de rechercher une éventuelle interaction entre l'huile de nigelle et l'huile de coloquinte.

Sept disques en papier Whatman (Figure N° 17) de 5,5 mm de diamètre sont appliqués sur une ligne droite à la surface du milieu déjà ensemencé, et Sept autres disques sont déposés de manière perpendiculaire par rapport aux premiers.

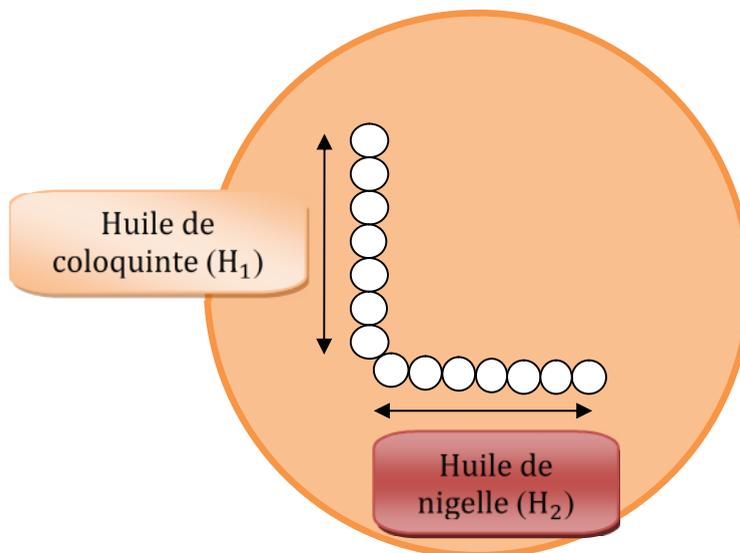


Figure N° 16 : Disposition des disques.

A l'aide d'une micropipette nous avons déposé l'huile de nigelle et l'huile de Coloquinte chacune dans une rangée à raison de 2µl sur chaque disque. La technique a été appliquée pour les dix souches microbiennes.

A la fin, nous avons incubés les dix boîtes à 37°C / 24h.

I. Résultats

I.1. Résultats de l'analyse d'HPLC

I.1.1. Chromatographie

Les deux chromatogrammes d'HPLC obtenus après l'analyse de l'échantillon de l'huile fixe de nigelle on utilisant la méthode d'HPLC décrite dans le chapitre II, montrent des pics sans interférence.

Le temps d'exécution pour l'analyse totale de chacun des quatre composants a exigé un temps <17 min.

D'après **Ghosheh *et al.*, (1999)**, les temps de rétention de chaque composant de quinones :Thymohydroquinone (THQ), Thymoquinone (TQ), Dithymoquinone (DTQ), et de composé phénolique le Thymol (THY), étaient :

- La THQ : 2.8 min
- La TQ : 6.8 min
- La DTQ : 8.9 min
- Le THY : 10.5 min

Dans le but de déduire les composants qui représentent chaque pic chromatographique, nous avons appliqué les données ci-dessus, de façon parallèle aux temps de rétention des pics obtenu dans nos deux chromatogrammes à 294 et 254 nm.

Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant ;

Tableau N° 09 : Les composants de l'échantillon de l'huile filtrée des graines de *N. sativa* détectés à 294 et 254 nm.

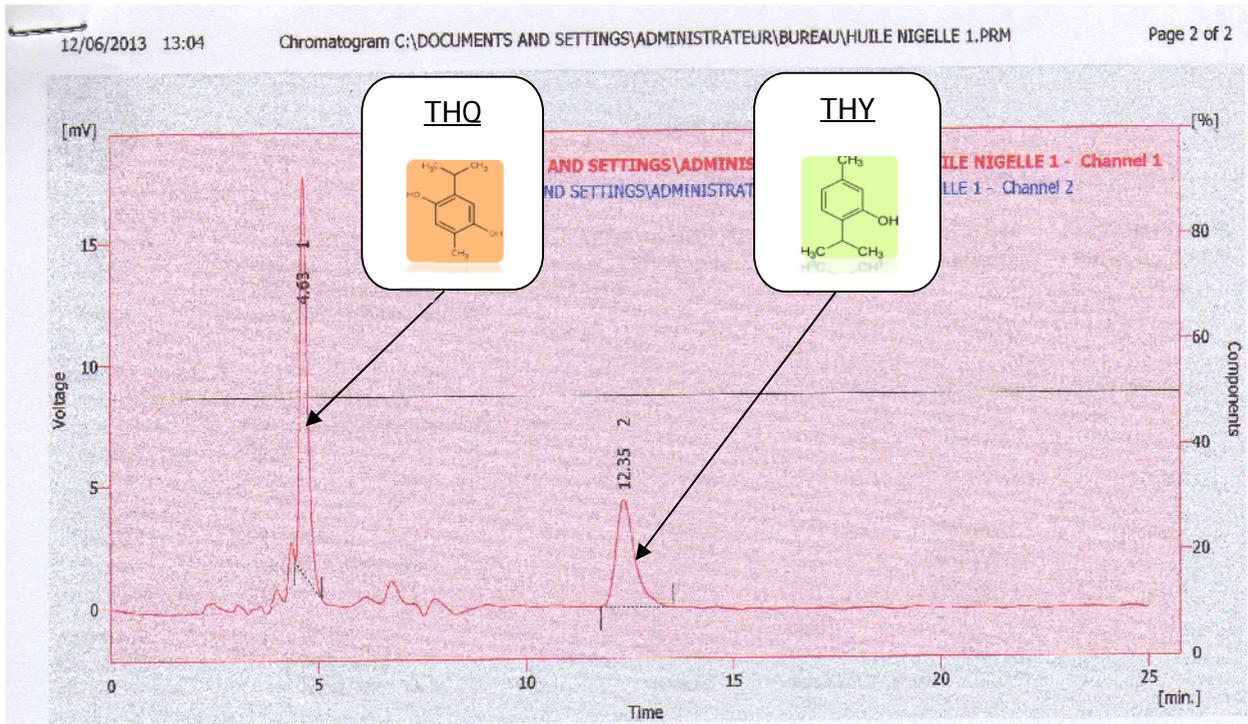
Composants détectés (pics N°)	temps de rétention (min)	Détections UV (nm)
Chromatogramme N°1 : ➤ Thymohydroquinone (1) ➤ Thymol (2)	➤ 4.63 ➤ 12.35	294
Chromatogramme N°2 : ➤ Thymoquinone (3) ➤ Dithymoquinone (4) ➤ Thymol (5)	➤ 3.77 ➤ 4.77 ➤ 14.43	254

Remarque

Les deux pics (1) et (2) du deuxième chromatogramme détectés à 254 nm aux temps de 1.08 et 2.78 min, sont considérés comme bruits de fond.

A l'aide de la base de données *scanview* 2011, la recherche de thymol a été effectuée à λ_{254} par analyse d'HPLC On utilisant une colonne de (2.1 x 50 mm, à diamètre 5 μ m) et un débit de phase mobile de 0,3 ml/min. L'analyse a donné un pic au temps de rétention de 4 min, semblable à nos deux pics (2) et (5) détectés successivement à 294 et 254 nm, aux temps de rétention de 12,35 et 14,43 min.

Chapitre III : Résultats et Discussions



Result Table (Uncal - C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\ADMINISTRATEUR\BUREAU\HUILE NIGELLE 1 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	4.633	207.020	16.267	59.9	78.8	0.20
2	12.350	138.656	4.385	40.1	21.2	0.48
	Total	345.676	20.652	100.0	100.0	

Result Table (Uncal - C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\ADMINISTRATEUR\BUREAU\HUILE NIGELLE 1 - Channel 2)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	2.433	17.822	0.458	3.1	1.5	0.45
2	3.583	4.748	0.339	0.8	1.1	0.30
3	3.983	14.045	1.013	2.4	3.4	0.28
4	4.350	31.273	2.948	5.4	9.8	0.18
5	4.633	274.774	17.954	47.5	59.5	0.22
6	6.117	27.852	0.761	4.8	2.5	0.72
7	6.750	44.342	1.414	7.7	4.7	0.42
8	7.783	16.519	0.685	2.9	2.3	0.43
9	9.083	8.037	0.211	1.4	0.7	0.83
10	12.350	138.656	4.385	24.0	14.5	0.48
	Total	578.068	30.167	100.0	100.0	

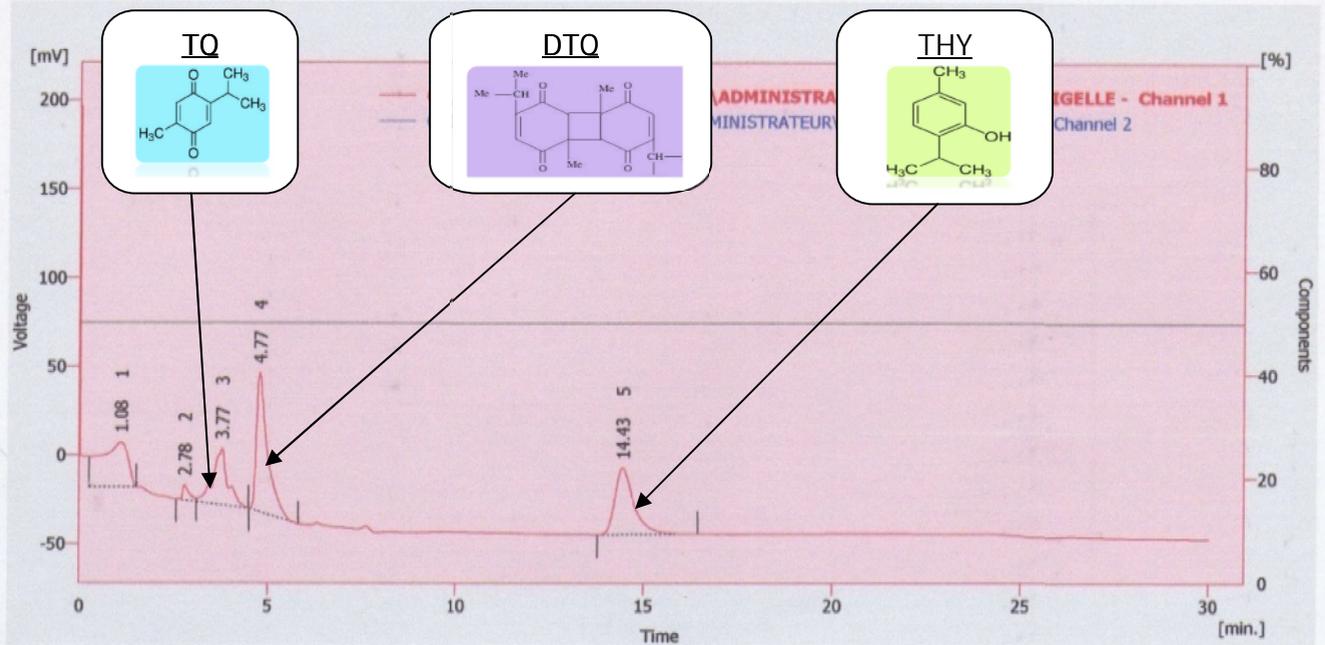
Fig.17 : chromatogramme de l'échantillon d'huile purifiée des graines de *N. sativa*, La détection a été effectuée à λ_{294} .

Chapitre III : Résultats et Discussions

12/06/2013 13:02

Chromatogram C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\ADMINISTRATEUR\BUREAU\HUILE NIGELLE.PRM

Page 2 of 2



Result Table (Uncal - C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\ADMINISTRATEUR\BUREAU\HUILE NIGELLE - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	1.083	1322.689	25.036	25.3	13.8	1.08
2	2.783	107.459	8.391	2.1	4.6	0.18
3	3.767	866.758	31.671	16.6	17.5	0.33
4	4.767	1591.742	78.428	30.5	43.3	0.28
5	14.433	1336.963	37.653	25.6	20.8	0.52
	Total	5225.611	181.179	100.0	100.0	

Result Table (Uncal - C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\ADMINISTRATEUR\BUREAU\HUILE NIGELLE - Channel 2)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	1.083	684.592	19.364	14.3	10.7	1.05
2	2.783	107.459	8.391	2.2	4.6	0.18
3	3.767	866.758	31.671	18.1	17.4	0.33
4	4.767	1591.742	78.428	33.2	43.2	0.28
5	6.283	34.235	1.691	0.7	0.9	0.20
6	7.583	36.234	2.602	0.8	1.4	0.25
7	8.233	17.608	0.496	0.4	0.3	0.57
8	9.467	40.973	0.497	0.9	0.3	1.43
9	14.433	1336.963	37.653	27.9	20.7	0.52
10	20.767	32.617	0.248	0.7	0.1	1.87
11	26.400	49.715	0.680	1.0	0.4	1.02
	Total	4798.896	181.723	100.0	100.0	

Fig.18 : chromatogramme de l'échantillon d'huile purifiée des graines de *N. sativa*, La détection a été effectuée à λ_{254} .

I.2. Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne

I.2.1. Isolement et purification

La revivification des dix souches de références a donné pour chacune d'elles, des colonies pures et homogènes dès le premier essai, dont l'aspect général correspond parfaitement avec le caractère phénotypique universel connu de ces souches.

Tableau N° 11 : Aspect général des souches sur les différents milieux utilisés.

Espèce	Milieu utilisé	Aspect des colonies
<i>E. coli</i>	Gélose Mac conkey	Colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur.
<i>Salmonella thyphimurium</i>	Gélose Hektoen	Colonies vertes à centre noir.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gélose Mac conkey	La fréquence de la mucosité des souches et la production de pigments rouge sombre.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gélose Mac conkey	Aspect muqueux, colonies de couleur rose.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose ausetrimide	Un pigment vert brillant diffusible caractérise les colonies.
<i>Proteus mirabilis</i>	Gélose Mac conkey	Colonies grosses, non hémolytiques, envahissant la surface de la gélose.

<i>Enterococcus faecalis</i>	Gélose B E A	Petites colonies incolores, entourées d'un halo noir.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gélose Chapman	Colonies crémeuses, opaques et pigmentées (typiquement jaune d'or).
<i>Bacillus cereus</i>	Gélose Mossel	Colonies de couleur rose entourées d'un halo opaque.
<i>Candida albicans</i>	Gélose Sabouraud	Grandes colonies rondes, de couleur blanche ou crème.

I.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile de nigelle et l'huile de coloquinte

I.2.2.1. Test de synergie de pouvoir antimicrobien des deux huiles végétales

En recherchant l'activité antimicrobienne des deux huiles végétales, seule l'huile de nigelle avait une activité antimicrobienne sur les espèces *S. aureus*, *B. cereus*, et *E. faecalis*, tandis que ces derniers ont présenté une résistance avec l'huile de coloquinte.

Ainsi, l'action de l'huile de nigelle sur les *S. aureus* était la plus importante (Figure N° 19), suivi par celle sur *B. cereus*, (Figure N° 20) dont la plus faible était celle sur *E. faecalis*, et cette différence s'est traduite par des zones d'inhibition de diamètre nettement variable.

Le résultat de ce test montre d'une part, la résistance des autres souches ; *E. coli*, *S. typhimurium*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *C. albicans*, aux deux huiles végétales utilisées (l'huile de nigelle, et l'huile de coloquinte) et d'autre part aucune interaction n'a été détectée entre les deux huiles.

Tableau N° 11: Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile de *N. sativa* sur les dix souches utilisées.

Espèces	Résultat de l'activité antimicrobienne de l'huile de <i>N. sativa</i> sur les dix souches utilisées	Gram (coloration)
<i>S. aureus</i>	++	souches à Gram positif
<i>B. cereus</i>	+	
<i>E. faecalis</i>	+	
<i>E. coli</i>	-	souches à Gram négatif
<i>S. thyphimurium</i>	-	
<i>A. baumannii</i>	-	
<i>K. pneumoniae</i>	-	
<i>P. aeruginosa</i>	-	
<i>P. mirabilis</i>	-	
<i>C. albicans</i>	-	

❖ **Résultat de l'activité antimicrobienne de l'huile de *N. sativa* sur les souches à Gram positif**



Figure N°19 : Photo personnelle; ZD de l'huile de nigelle sur *S. aureus*.



Figure N° 20 : Photo personnelle; ZD de l'huile de nigelle sur *B. cereus*.



Figure N° 21 : Photo personnelle; ZD de l'huile de nigelle sur *E. faecalis*.

ZD : Zone d'inhibition.

❖ **Résultat négatif de l'activité antimicrobienne de l'huile de *N. sativa* sur les souches à Gram négatif**

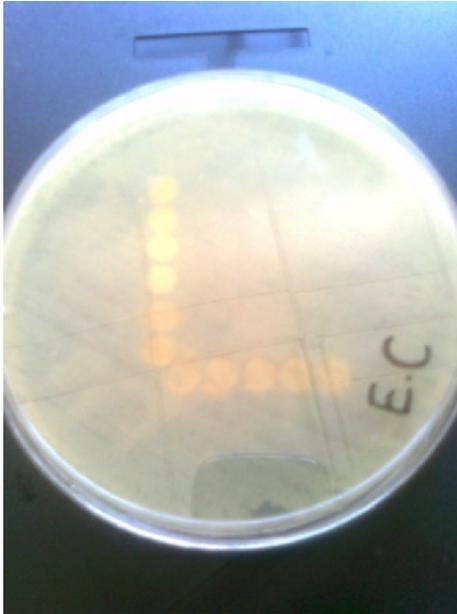


Figure N° 22 : Photo personnelle;
Résultat négatif pour la boîte d'
E. coli.



Figure N° 23 : Photo personnelle ;
Résultat négatif pour la boîte
de *S. typhimurium*.



Figure N° 24 : Photo personnelle;
Résultat négatif pour la boîte d'
A. baumannii.



Figure N° 25 : Photo personnelle ;
Résultat négatif pour la boîte de
K. pneumoniae.



Figure N° 26 : Photo personnelle;
Résultat négatif pour la boîte de
P. aeruginosa.



Figure N° 27 : Photo personnelle;
Résultat négatif pour la boîte de
P. mirabilis.



Figure N° 28 : Photo personnelle;
Résultat négatif pour la boîte de
C. albicans.

II. Discussion

II.1. Discussion des résultats de l'analyse d'HPLC

Cette étude démontre que l'huile brute de nigelle contient des composés quinoniques : Thymoquinone, Dithymoquinone, Thymohydroquinone, et un composé phénolique Thymol, détectés à des temps de rétention différents.

II.1.1. Discussion des Chromatogrammes

Les résultats de nos deux chromatogrammes correspondent bien aux travaux de **Ghosheh et al., (1999)** qui ont trouvé avec la même méthode que l'huile fixe de nigelle contient des dérivés phénoliques (thymoquinone, dithymoquinone, thymohydroquinone, et le thymol).

Les graines de *N. sativa* se composent d'huiles fixes (environ 30%) et d'huiles volatiles (moyenne 0.5%, maximum 1.5%) ; ces graines sont également une source riche en acides gras insaturés, acides aminés et les protéines, hydrates de carbone, et les quinones (telles que la thymoquinone, nigellone, et la thymohydroquinone) (**Hosseinzadeh et Parvardeh ; 2004**).

La photodimérisation de la thymoquinone aboutit à la dithymoquinone anciennement citée sous le nom de nigellone.

Nous retrouverons également les quatre composés de quinones dans l'huile essentielle extraite des graines de *Nigella sativa* (**Houghton et al., 1995**).

Nos deux chromatogrammes montrent que les composants d'huile détectés ont des temps de rétention différents et ils sont également différents par rapport à ceux obtenus par **Ghosheh et al., (1999)**.

La nature des constituants a été séparée par l'appareil d'HPLC est accordée systématiquement à la polarité de la colonne utilisée :

- Le thymol a été le plus polaire, parce que il présente une forte interaction avec la silice apolaire de la colonne, c'est pour ça son temps de rétention est le plus long : 14.43 min à 254 nm, et 12.35 min à 294 nm.

- Les composants : TQ, DTQ, et THQ ont été les moins polaires que le thymol puisque ils présentent une faible interaction avec la silice de la colonne, et par conséquent leurs temps de rétention sont les plus courts : (TQ : 3.77 min, DTQ : 4.77 min) à 254 nm, et THQ : 4.63 min à 294 nm.

Nous avons détectés ces composants de quinone d'huile de nigelle on utilisant la Colonne C18 125 d'HPLC apolaire en Silice (150 mm x 4,6 mm, dimension particulaire 5 µm) avec un débit de 1 ml/min.

Selon l'étude de **Hosseinzadeh et al., (2007)**, le composé Thymoquinone de l'échantillon d'huile purifiée de graines de *Nigella sativa* a été détecté au temps de rétention de 30 min à 254 nm.

Ces chercheurs ont détectée la TQ par HPLC on utilisant la colonne C18 analytique à phase renversée de (250 x 4.6 mm, dimension particulaire 4.6µm) avec un débit de 1 ml/min.

D'autre par, **Ghosheh et al., (1999)**, ont détecté la Thymoquinone de l'échantillon d'huile purifiée de graines de *Nigella sativa* au temps de rétention de 6.4 min à 254 nm.

La quantification de TQ selon **Ghosheh et al., (1999)**, a été effectuée par HPLC on utilisant la colonne C18 analytique à phase renversée de (300 x 3.9 mm, dimension particulaire 10 µm) avec un débit de 2 ml/min.

Ces données (mode opératoire, type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, ainsi que le débit de la phase mobile) utilisées lors d'une analyse d'HPLC, influent directement sur les temps de rétention des composants détectés dans l'huile de nigelle.

II.1.2. Discussion de la quantification

Selon l'étude de **Ghosheh et al., (1999)**, la quantification des quatre constituants (thymoquinone, dithymoquinone, thymohydroquinone, et le thymol) présents dans une huile commerciale de nigelle achetée en Egypte a donnée des résultats visibles dans le tableau ci-dessous.

Tableau N° 12 : Teneur en quinones d'une huile commerciale de graines de *N. sativa* (**Ghosheh et al., 1999**).

Composants	Teneur en % d'huile
Thymoquinone	$5,26 \times 10^{-2} \pm 2,59 \times 10^{-3}$
Thymohydroquinone	$7,67 \times 10^{-4} \pm 5,49 \times 10^{-5}$
Dithymoquinone	non quantifiable*
Thymol	$9,12 \times 10^{-3} \pm 1,38 \times 10^{-3}$

* = en dessous des limites quantifiables : $2,12 \times 10^{-4}$ % d'huile.

Ce qui fait une teneur totale en Thymoquinone + Thymohydroquinone + Thymol de 624,87 $\mu\text{g/g}$ d'huile de nigelle.

Selon l'étude de **Ghosheh et al., (1999)**, l'huile commerciale de nigelle est riche en thymoquinone et en thymol par rapport aux teneurs très faibles de la Thymohydroquinone et Dithymoquinone, mais avec des teneurs peu importantes.

Ces résultats correspondent aux travaux de **Al-Saleh *et al.*, (2006)**, qui ont trouvé par l'analyse d'HPLC que toutes les différentes marques des graines de *N. sativa* étaient riches en thymoquinone et en thymol.

D'après l'étude de **Ghosheh *et al.*, (1999)**, la dithymoquinone n'était pas discernable dans l'huile commerciale.

Ce pendant, la présence de DTQ est toujours un constituant important en huile de graines de nigelle, particulièrement en ce qui concerne la nature des méthodes d'extraction utilisées pour produire cette huile.

En outre, **El-Dakhakhny *et al.*, (2002)**, ont démontré que le constituant principal des quinones de la graine de nigelle était la DTQ (nommé nigellone), ils ont conclu qu'elle est formée par l'intermédiaire de la photodimerisation de la TQ par suite d'exposition à la lumière du soleil pendant les procédures de séparation et d'extraction.

La teneur totale en dérivés phénoliques de graines de nigelle turques déterminée par **Nergiz et Ötles (1993)** selon la méthode de **Nergiz et Ünal (1991)** est comme suit : $1744 \pm 10.6 \mu\text{g/g}$ d'huile.

Ce qui est supérieur à la valeur déterminée dans l'étude de **Ghosheh *et al.*, 1999**, estimée dans l'huile commerciale de nigelle égyptienne à $624,87 \mu\text{g/g}$ d'huile.

Cette variation de teneur en composants de quinone des graines de nigelle a été observée aussi dans les travaux de **Al-Saleh *et al.*, (2006)**, qui ont trouvé que Les graines importées d'Ethiopie contiennent des niveaux plus élevés du thymoquinone (3098.5mg/kg) et du thymol (230.6mg/kg). Le niveau le plus bas de la thymoquinone (1274.6mg/kg) et du thymol (113.4mg/kg) ont été observés dans les graines importées du Soudan.

Il est a noté que la provenance géographique des graines modifie leurs compositions chimiques, l'étude de **Houghton *et al.*, (1995)**, révèle une teneur 3 fois supérieure de la thymoquinone des différentes huiles fixes de graines de nigelle:

- Huile commerciale "Al-Amin" achetée en Arabie, de graines de provenance

inconnue : 0,15%

- Huile commerciale “Al-Khaial” achetée en Arabie, de graines de provenance

inconnue : 0,13%

- Huile extraite de graines éthiopiennes par Soxhlet à l'éther de pétrole : 0,17%

Hosseinzadeh et al., (2007), ont trouvé par analyse d'HPLC une forte teneur en thymoquinone de 0.58% w/w dans un échantillon d'huile des graines de *N. sativa* Commercialisé en Iran.

La teneur en constituants de quinone n'est pas la même dans l'huile brute et l'huile essentielle de nigelle car selon **Houghton et al., (1995)** la Thymoquinone a la particularité d'être présente à la fois dans l'huile fixe de graines de *N. sativa* (0,05% à 0,15 %) et dans l'huile essentielle où les teneurs sont très variables suivant la provenance : de 0,6 % à parfois plus de 25%.

Burits et Bucar ; (2000), ont prouvé que le contenu de thymoquinone dans les graines et huiles commercialisées de *N. sativa* étaient différent. Ceci est du au pays d'origine et au processus de fabrication. Une telle variation doit être prise en compte, parce qu'elle pourrait se refléter dans les propriétés pharmacologiques des huiles.

Selon **Khan et al., (2006)**, La chaleur et la lumière affectent les niveaux des constituants d'huile de nigelle, selon leurs stockage et processus de fabrication, ces conditions fassent une différence dans les quantités des constituants de quinone.

II.2. Discussion des résultats de l'activité antimicrobienne

II.2.1. L'huile de Nigelle

Cette étude démontre que l'huile de nigelle a une activité variable sur les souches à Gram positif qui sont *S. aureus*, *B. cereus*, et *E. faecalis*, dont la plus forte est celle sur *S. aureus*, traduite par une zone d'inhibition importante.

Ce résultat correspond bien aux travaux de **Harzallah et al., (2012)** qui ont trouvé avec la méthode de diffusion des disques, que la souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 était la plus sensible parmi l'ensemble des souches testées dont le diamètre de la zone d'inhibition était de l'ordre de 16.66 mm.

La grande sensibilité des *S. aureus* à l'huile de nigelle a été confirmée aussi par la méthode des puits selon les résultats de **Mariam et Abu-Al-basal (2009)**.

Nos résultats montrent que parmi les bactéries à Gram positif l'espèce *E. faecalis* était la moins sensible vis-à-vis d'huile de nigelle, ce qui concorde avec les résultats de **Harzallah et al., (2012)**, qui ont démontré avec la méthode de diffusion des disques un diamètre d'inhibition ne dépassant pas les 9.33 mm.

Contrairement à ces résultats, d'autres chercheurs n'ont trouvé aucune activité de l'huile de nigelle sur *E. faecalis* (**Kökdil et al., 2005**).

Dans le cas des bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *S. typhimurium*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*) l'huile de *N. sativa* n'a exercé aucune activité antimicrobienne, ce qui est prouvé par les travaux de **Kökdil et al., (2005)** et **Mariam et Abu-Al-basal (2009)**.

D'autre part **Harzallah** et son équipe (2012) ont prouvé que cette huile a un très faible pouvoir d'inhibition sur *E. coli* traduit par un diamètre de 7mm, tandis que ce pouvoir reste relativement modéré sur *P. aeruginosa* avec un diamètre de 12.33 mm.

Concernant l'activité antifongique, notre huile semble être inactive sur *C. albicans*, ce qui est en accord avec les résultats enregistrés par **TANIS et al.,(2009)** et ceux de **Mariam et Abu-Al-basal (2009)**. En revanche d'autres chercheurs signalent que

la levure *C. albicans* présente une légère sensibilité vis-à-vis de l'huile en question (**Harzallah et al., 2012**).

En outre, les résultats de **Khan, (2003)** ont prouvé que les extraits de la graine de *N. Sativa* possèdent une activité *in vivo* contre *C. albicans* infectant la rate, le foie, et les reins.

Selon **Mariam et Abu-Al-basal (2009)** l'activité antimicrobienne de l'huile de *N. Sativa* peut être expliquée par la présence des constituants ayant un grand pouvoir antimicrobien avec des concentrations élevées. Le mode spécifique de l'action de ces constituants actifs est attribué à leur composition chimique et leur morphologie (**Enwuru et al., 2008**).

Les constituants des graines de *Nigella sativa* tels que la thymoquinone est caractérisée par plusieurs activités pharmacologiques telles qu'anti-inflammatoire (**Mutabagani et El-Mahdy; 1997**), et antibactérienne (**Hosseinzadeh et al., 2007 ; Morsi, 2000**).

Les études de **Manou et al., (1998) ; Mazino et al., (1999)**, ont confirmé les propriétés antimicrobiennes du thymol extraites à partir du *Thymus vulgaris* L.

Le Thymol et carvacrol, isolées dans des herbes telles que le thym, sont des membres de la famille de menthane dans laquelle la structure de cyclohexane a été oxydée à un anneau (phénolique) aromatique. Les huiles contenant ces terpènes phénoliques se sont avérées particulièrement efficaces en tant qu'agents antibactériens (**Crozier et al., 2006**).

Ces données confirment que la thymoquinone et le thymol d'huile de graines de *Nigella sativa* ont des effets antibactériens sur les souches à gram positif utilisées.

Cependant **McCutcheon et al., (1995)** et **Harzallah et al., (2012)** soulignent fortement que l'origine de l'activité antimicrobienne de cette huile pourrait être

Attribuée à la présence de certains acides gras tels que l'acide linoléique (58.73% des AGT) et l'acide oléique (21.67% des AGT) qui demeurent des composés majoritaires.

D'autres études ont montré que les acides gras insaturés à long chaîne sont des substances bactéricides des microorganismes pathogènes incluant la *S. aureus* résistant à la Methicillin (SARM) responsable de la surinfection post opératoire (**Nadkarni, 1976**), *H. pylori* responsable des ulcères gastroduodénaux (**Nickavara et al., 2003**), et les Mycobactéries responsables de la lèpre et de la tuberculose (**Nilsson, 1978**).

Bien que l'acide linoléique et l'acide oléique soient des composés majoritaires de l'huile fixe de *N. sativa*, il est probable que d'autres composés peuvent agir en mode d'addition ou de synergie en augmentant les propriétés antimicrobienne de cette huile (**Harzallah et al., 2012**).

Nos résultats ont montré l'absence de l'activité antibactérienne envers les bactéries à Gram négatif, alors que **Gulluce et al., (2003)** et **Mariam et Abu-Al-basal (2009)** ont trouvé une activité antibactérienne insignifiante vis-à-vis de certaines bactérie à Gram négatif.

Cette inefficacité pourrait être corrélée à la différence morphologique et à la diversité des mécanismes biochimique et génétique entre la flore à Gram positif et celle à Gram négatif.

Il est connu que les bactéries à Gram négatif ont une membrane externe ce qui rend leur paroi cellulaire imperméable aux agents antimicrobiens (**Mariam et Abu-Al-basal 2009**).

ainsi la paroi des Gram positif est composé uniquement du peptidoglycane ce qui les prédisposent a une importante sensibilité aux agents antimicrobiens (**Enwuru et al., 2008 ; Salman et al., 2008**).

D'autres chercheurs ont démontré que des extraits bruts des gaines de *N. sativa* ont un effet inhibiteur sur des microorganismes réputés pour leur multi-résistances, y

compris l'espèce *Vibrio choléra*, *S. aureus*, *Shigella*, et *C. albicans* (**Salman et al., 2008**).

Plusieurs études consacrées à l'huile essentielle de *N. sativa* et ses constituants, ont révélés qu'elle est également dotée de grandes propriétés antimicrobiennes qui pourraient être due à la présence de Thymoquinone, Thymohydroquinone, et de Thymol (**Aljabre et al., 2005 ; Randhawa et al., 2005**).

II.2.2. L'huile de coloquinte (*Citrullus colocynthis*)

Les résultats de nos tests ont montré que les dix souches bactériennes : *S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. thyphimurium*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, et *C. albicans* présentent des résistances à l'huile de coloquinte. Cette résistance a été déjà signalée par les travaux de **Boublenza, (2011)** sur les espèces *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*.

(Marzouk et al., 2009 ; Marzouk et al., 2010) ont travaillé sur les extraits de toutes les parties de la plante *Citrullus colocynthis* tels les racines, la tige, les feuilles, les fruits et les graines, et il sont démontré que toutes les parties possèdent une activités antibactérienne contre les Gram positif (*E. faecalis* et *S. aureus*) et les Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) mais à un degré moindre pour les racines.

Les fruits et les graines qui n'ont pas atteint leur maturité ont été les plus actifs contre les bactéries déjà citées ; ces auteurs ont également montré que les métabolites secondaires (exemple les alcaloïdes et les flavonoïdes) diffèrent d'une région à l'autre en quantité et en qualité donc l'activité antibactérienne de chaque partie de la plante est tributaire de sa composition **(Marzouk et al., 2009 ; Marzouk et al., 2010)**.

Cette activité antibactérienne de l'huile de coloquinte est due à la présence de certains composés dont les hydrates de carbone, les flavonoïdes, les glycosides et les tannins qui sont présent dans l'extrait de la plante *Citrullus colocynthis*, cet extrait utilisé par **Memon, et son équipe (2003)** a été significativement active, et a montré l'inhibition de la croissance appréciable de *S. aureus*, *Bacillus pumilus* et *Bacillus subtilis*, par contre l'activité antibactérienne contre *E. coli* et *P. aeruginosa* a été négligeable.

Ces résultats controversés peuvent être expliqué par :

- Les différentes techniques utilisés pour l'extraction des différentes huiles **(Hanafy, 1991; Mashhadian, 2005 ; Salman, 2008).**
- La différence entre les études *in vivo* et *in vitro* **(Khan 2003 ; Mashhadian, 2005).**
- La sensibilité et l'exactitude des testes antimicrobiens.
- La concentration et l'efficacité des constituants des extraits.
- Les conditions et la saison de la récolte **(Mashhadian, 2005).**
- Les méthodes de stockage et de conservation des extraits.

CONCLUSION :

Il ressort de cette recherche, que l'huile brute des graines de *Nigella sativa* présente des composants de quinones : thymoquinone, dithymoquinone, thymohydroquinone, et un composé phénolique : thymol.

Ces quinones sont des composés actifs de l'huile de Nigelle lui conférant d'importantes propriétés pharmacologiques.

Les résultats indiquent que les deux huiles testées à savoir l'huile de coloquinte et l'huile de nigelle, seule cette dernière a révélé une activité antibactérienne.

Cette activité a été plus prononcée sur la flore à Gram positif, en l'occurrence *Staphylococcus aureus*, moins sur *Bacillus cereus*, alors qu'elle est très faible sur *Enterococcus faecalis*.

La présence des composants de quinones dans l'huile de nigelle comme la thymoquinone, thymol, et de certaine acide gras insaturés à longue chaîne tel que l'acide linoléique et l'acide oléique pourrait être à l'origine de cette efficacité.

La combinaison des huiles de nigelle « *Nigella sativa* », et Coloquinte « *Citrullus colocynthis* » utilisées indique une absence de synergie de pouvoir antimicrobien.

Nous avons remarqué que les bactéries à Gram négatif se sont caractérisées par une insensibilité par rapport aux deux huiles testées. Ces résultats pourraient être expliqués par une différence fondamentale entre la flore à Gram positif et celle à Gram négatif.

Cette différence touche l'aspect morphologique ainsi que les mécanismes génétiques propres à chaque espèce.

Cette inefficacité des huiles testées a également concerné *Candida albicans* qui n'a manifesté aucune sensibilité.

Pour approfondir ce travail, il serait plus intéressant d'exploiter par chromatographie en phase gazeuse et on utilisant des étalons appropriés pour trouver d'autres molécules à l'origine de cette propriété antimicrobienne.

Ces derniers doivent être appliqués sur les souches utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne des composants actifs d'huile de nigelle.

Enfin, il serait plus judicieux de révéler la toxicité de ces molécules pour pouvoir les utiliser comme additif alimentaire ou dans des études thérapeutique *in vivo*.

Références bibliographiques

A

- ❖ Abdel-Fattah A.M., Matsumoto K., Watanabe H. (2000). Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. *European journal of pharmacology*. **400**: 89-97.
- ❖ Abdel-Wahhab M.A., Aly S.E., (2005). Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (glove) in rats during aflatoxicosis. *Journal of applied toxicology*. **25**: 218-223.
- ❖ Aboun A., Aoun L., Bendimerad K., Boukerrou A., Kechich S., (2001). Antibiogramme en médecine vétérinaire. Standardation de l'aromatogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. Algérie édition.
- ❖ Aboutabl E., El-Azzouny A., & Hammerschmidt F. (1986). *Aroma volatiles of Nigella sativa L. seeds. Progress in Essential Oil Research*. Berlin, New York: Walter de Gruyter & Co.
- ❖ Agrawal R., Kharya M.D., Shrivastava R. (1979). Antimicrobial anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian journal of experimental biology*. **17**: 1264-1265.
- ❖ Ait Mbarek L., Ait Mouse H., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., A. Dalal and Zyada., (2007). Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts, *Braz J Med Biol Res Online Ahead of Print* ISSN 0100-879X, p.2.
- ❖ Alami S., (1989). *La phytothérapie ancestrale actuelle et d'avenir*. Thèse de Médecine, Casablanca.

- ❖ Ali B.H., Blunden G., (2003). Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*, *Phytother. Res.* **17** 299–305

- ❖ Aljabre SHM, Randhawa MA, Akhtar NOM, Alqurashi AM, Aldossary A. (2005). Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *J. Ethnopharmacol.*, **101**: 116–119.

- ❖ Al-Jassir, M.S. (1992). Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chem.*, **45**: 239–242.

- ❖ Al-Hader A., Aqel M., Hasan Z. (1993). Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *International Journal of Pharmacognosy.* **31**: 96-100.

- ❖ Ali B.H., Blunden G. (2003). Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy research.* **17** : 299-305.

- ❖ Aljabre S.H.M., Randhawa M.A., Akhtar N., Alakloby O.M., Alqurashi A.M., Aldossary A. (2005). Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology.* **101**: 116-119.

- ❖ Al-Nassimi M. (1984). *La médecine moderne et la science du prophète* (éd. 3e édition). Damas: Acharika.

- ❖ Al-Saleh I.A., Billedo G., El-Doush I.I. (2006). Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *Journal of Food Composition and Analysis.* **19**: 167-175.

- ❖ Altan M.F., Kanter M., Donmez S., Kartal M.E., Buyukbas S. (2007). Combination therapy of *Nigella sativa* and human parathyroid hormone on bone mass, biomechanical behavior and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta histochemica.* **109** : 304-314.

- ❖ Anonyme. (2012). Plantes et Botanique. *Botanique*. Consulté le 10 Janvier 2012, sur PLANTES ET BOTANIQUE: http://www.plantes-botanique.org/sousclasse_magnoliidae.
- ❖ Ansari A., Hassan S., Kenne L., Atta U.R., & Wehler J. (1988). Structural studies on a saponin isolated from *Nigella sativa*. *Phytochemistry* (27), pp. 3977-3979.
- ❖ Antuono F., Hamaza K. (2002). Composition of *Nigella sativa* and *Nigella damascene* from Egypt. *Planta medica*. **27**: 142 -149.
- ❖ Atta M.B., Imaizumi K. (1998). Antioxidant activity of nigella (*Nigella sativa* L.) seeds extracts. *JAPAN Oil Chemists' Society*. **47**: 49-54.
- ❖ Atta U.R., Malik S., Cun-Heng H., Clardy J. (1985a). Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters*. **26**: 2759-2762.
- ❖ Atta U.R., Malik S., Ahmed S., Choudhary M.I., Habib-ur-Rehman. (1985b). Nigellimine-N-oxide-a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Heterocycles*. **23**: 935-955.
- ❖ Atta U.R., Malik S., Zaman K. (1992). Nigellimine, a new isoquinoline from the seeds of *Nigella sativa*. *Journal of natural products*. **55**: 676-678.
- ❖ Awad E.M. (2005). *In vitro* decrease of the fibrinolytic potential of cultured human fibrosarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil. *Phytomedicine*. **12**: 100-107.

B

- ❖ Badary O.A., Al-Shabanah, O.A., Nagi, M.N., Al-Rikabi A.C., Elmazar M.M. (1999). Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone. *European journal of cancer prevention*. **8**: 435-440.
- ❖ Badary O.A., Gamal A.M. (2001). Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer detection and prevention*. **25**: 362-368.
- ❖ Badary, O.A., Taha, R.A., Gamal El-Din, A.M., Abdel-Wahab, M.H. (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and chemical toxicology*. **26**: 87-98.
- ❖ Benhaddou Andaloussi Ali (2009) - Étude des propriétés antidiabétiques de *Nigella sativa* : sites d'action cellulaires et moléculaires. Mém. (PhD). Pharmacologie. Univ. Montréal. pp 43-45.
- ❖ Benkaci–Ali, F., Baaliouamer, A., Meklati, B.Y., Chemat, F. (2007). Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour & Fragrance Journal*. **22**: 148-153.
- ❖ Blumenthal M., W.Busse A., Goldberg V.H., & Gruenwald J.T., Hall C.W. (2002). *Encyclopédie des plantes médicinales* : identification, préparations, soins par les extraits embryonnaires végétaux. **275**: 1603-1609.
- ❖ Bonnier G. (1990). La grande flore en couleur. Ed Belin, Paris. Tome 1.
- ❖ Boskabady, M.H., Shirmohammadi, B. (2002). Effect of *Nigella sativa* on isolated guinea pig trachea. *Archives of Iranian Medicine*. **5**: 103-107.
- ❖ Boskabady, M.H., Shahabi, M. (1997). Bronchodilatory and anticholinergic effects of *Nigella sativa* on isolates guinea-pig tracheal chains. *Iranian Journal of Medical Sciences*. **22**: 127-133.

- ❖ Boskabady, M.H., Shiravi, N. (2000) Inhibitory effect of *Nigella sativa* on histamine (H1) receptors of isolated guinea pig tracheal chains. *The European respiratory journal* . **16**: 461.
- ❖ Boskabady, M.H., Shirmohammadi, B., Jandaghi, P., Kiani, S. (2004). Possible mechanism(s) for relaxant effect of aqueous and macerated extracts from *Nigella sativa* on tracheal chains of guinea pig. *BMC Pharmacology*. **4**: 3-8.
- ❖ Burits M., Bucar F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*. **14**: 323-328.
- ❖ Büyüköztürk S., Gelincik A., Özşeker F., Genç S., Şavran FO., Kıran B., Yıllar G., Erden S., Aydın F., Çolakoğlu F., Dal M., Özer H., Bilir A. (2005). *Nigella sativa* (black seed) oil does not affect the T-helper1 and T-helper 2 type cytokine production from splenic mononuclear cells in allergen sensitized mice. *Journal of Ethnopharmacology*. **100**: 295-298.

C

- ❖ Canonica L., Jommi G., Scolastico C., & Bonati A. (1963). The pharmacologically active principle in *Nigella sativa*. *Gazzetta chimica italiana* **93**:1404-1407.
- ❖ Cemek M., Enginar H., Karaca T., Unak P. (2006). *In vivo* radioprotective effects of *Nigella sativa* L oil and reduced glutathione against irradiation-induced oxidative injury and number of peripheral blood lymphocytes in rats. *Photochemistry and photobiology*. **82**: 1691-1696.
- ❖ Chakravarty N. (1993). Inhibition of histamine release from mast cells by nigellone. *Annals of allergy*. **70** : 237-242.

- ❖ Chamseddine A. (2006). *La curation par la graine noire d'après la sunna prophétique et la médecine antique et moderne* (3e éd.). (A. ABOUD, Trad.) Beyrouth: Dar-Al-Kotob Al-Ilmiyah.
- ❖ Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. (2006). *Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. By Blackwell Publishing Ltd.

D

- ❖ Daba M.H., Abdel-Rahman M.S. (1998). Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicology letters*. **95**: 23-9.

E

- ❖ El-Abhar H.S., Abdallah D.M., Saleh 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*. **84**: 251-258.
- ❖ El-Dakhakhny M. (1965). Studies on the Egyptian *Nigella sativa* L. Some pharmacological properties of the seeds active principle in comparison to its dihydro compound and its polymer. *Arzneimittelforschung*, **15**: 1227-1229.
- ❖ El-Dakhakhny M., Barakat M., Abd EI-Halim M., Aly S.M. (2000). Effect of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **72**: 299-304.
- ❖ El-Dakhakhny M., Mady N.J., Lembert N., Ammon H.P.T. (2002). *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-

- lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. J. Ethnopharmacol. 81: 161-164.
- ❖ El-Dakhakhny M., Mady N.J., Lember N. (2002). The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions. *Planta medica*. **65**: 465-466.
 - ❖ El-Kadi A., Kandil O., Tabuni A.M. (1987). *Nigella sativa* cell-mediated immunity. *Archives of AIDS research*. **1**: 232-233.
 - ❖ El-Mahmoudy A., Shimizu Y., Shiina T. (2005). Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *International immune pharmacology*. **5**: 195-207.
 - ❖ El-Mahmoudy A., Matsuyama H., Borgan M.A., Shimizu Y., El-Sayed M.G., Minamoto N. (2002). Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *International immune pharmacology*. **2**: 1603-1611.
 - ❖ El-Saleh S.C., Al-Sagair O.A., Al-Khalaf M.I. (2004). Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *International journal of cardiology*. **93**: 19-23.
 - ❖ Enwuru, N.V., S.O. Ogbonnia, F. Nkemhule, C.a. Enwuru and O. Tolani, (2008). Evaluation of antibacterial activity and acute toxicity of the *Stachytarpheta angustifolia* (Mill) Vahl. *Afr. J. Biotechnol.*, **7**: 1740-1744.

F

G

- ❖ Ghannadi A., Hajhashemi V., Jafarabadi. (2005). An investigation of the analgesic and anti-inflammatory effects of *Nigella sativa* seed polyphenols . *Journal of medicinal food*. **8**: 488-493.
- ❖ Ghedira K. (2006). La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, **4**: 1-7.
- ❖ Ghosheh O.A., Houdi A.A., Crooks P.A. (1999). High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **19** : 757–762.
- ❖ Gilani A.H., Aziz N., Khurram I.M., Chaudhary K.S., Iqbal A. (2001). Bronchodilator, spasmolytic and calcium antagonist activities of *Nigella sativa* seeds (Kalonji): a traditional herbal product with multiple medicinal uses. *J Pak Med Assoc.*; **51**: 115-120.
- ❖ 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.
- ❖ Greenish H. (1880). *Contribution to the Chemistry of Nigella sativa* (Vol. 10). *Pharmac J Trans*.
- ❖ Guignard J.L. (2001). In : *Botanique systématique moléculaire* . 12^{ème} Edition *Masson (Paris)*, P: 304.
- ❖ Gulluce M., Sokmen M., Daferera D., Agar G., Ozkan H., Kartal N., Polissiou M., Sokmen A., Sahin F. (2003). *In vitro* antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 3958–3965.

H

- ❖ Hacek D M., Noskhin G A., Trakas K and Peterson L R.(1995). Initial use of a broth microdilution method suitable for in vitro testing of fungal isolates in a clinical microbiology laboratory. *J.Clin. Microbiol* .1995, 33(7):1884.
- ❖ Hanafy M.S and Hatem M.E. (1991). Studies on the ant-microbial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *Ethnopharmacol*. 34: 275-8.
- ❖ Haq A., Abdullatif M., Lobo P.I., Khabar K.S.A., Sheth K.V., Al-Sedairy S.T. (1995). *Nigella sativa* : effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. *Immunopharmacology*. **30**: 147-155.
- ❖ Harzallah H.J., Noumi E., Bekir K., Bakhrouf A and Mahjoub T. (2012). Chemical composition, antibacterial and antifungal properties of Tunisian *Nigella sativa* fixed oil. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(22) pp. 4675-4679.
- ❖ Hawsawi Z.A., Ali B.A., Bamosa A.O. (2001) Effect of *Nigella sativa* (Black seed) and thymoquinone on blood glucose in albino rats. *Annals of Saudi medicine. Med*. **21**: 242-244.
- ❖ Hosseinzadeh H., Parvardeh S. (2004). Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine*. 11: 56-64.
- ❖ Hosseinzadeh H., Parvardeh S., Asl M.N., Sadeghnia H.R., Ziaee T. (2007). Effect of thymoquinone and *Nigella sativa* seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus. *Phytomedicine*. **14**: 621-627.
- ❖ Houcher Z., Boudiaf K., benboubetra M., Houcher B. (2007). Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa* L. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats. *Pteridines*. **18**: 8-18.

- ❖ Houghton P.J., Zarka R., De Las Heras B., Hoult J.R.S. (1995). Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leucocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.* **61**: 33-36.

I

- ❖ Ibn Al-Qaïm, A. (1957). *La médecine du prophète*. Beyrouth: Al fikr.
- ❖ Ibn-Sina. (1972). *La loi de la médecine, le livre des médicaments et des plantes*. Beyrouth: Maktab Attollab.
- ❖ Iddamaldeniya S.S., Wickramasinghe N., Thabrew I. & Thammitiyagodage M.G. (2003). Protection against diethylnitrosoamine-induced hepatocarcinogenesis by an indigenous medicine comprised of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* : a preliminary study. *Journal of Carcinogenesis.* **2**: 1-6.

J

K

- ❖ Khan M.A.U., Ashfaq M.K., Zuberi H.S., Mahmood M.S., Gilani A.H. (2003). The *in vivo* Antifungal Activity of the Aqueous Extract from *Nigella sativa* Seeds. *Phytother. Res.* **17**: 183–186.
- ❖ Khan M.T.H., Gali-Muhtasib H., El-Najjar N., Schneider-Stock R. (2006). The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components. *Lead Molecules from Natural Products.* **133**: 183–186.
- ❖ Khanna T., Zaidi F.A., Dandiya P.C. (1993). CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitoterapia.* **64**: 407-410.

- ❖ Kökdil G., Delialioğlu N., Özbilgin B., EmekdaşG. (2005). Antilisterial activity of *ballota* species growing in turkey antibacteria activity screening of *nigella* l. species growing in turkey. Mersin University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Yenişehir Campus, 33169 Mersin, TURKEY. Ankara Ecz. Fak. Derg., 34 (3) 183 - 190 .
- ❖ Kökdil G., Yılmaz H. (2005). Analysis of the fixed oils of the genus *Nigella* L. (Ranunculaceae) in Turkey .*J Biochemical Systematics and Ecology* **33**: 1203-1209.
- ❖ Kumara S.S., Huat B.T. (2001). Extraction, isolation and characterization of antitumor principle, alpha-hederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta medica*. **67**: 29-32.

L

M

- ❖ Mahfouz M., & El-Dakhakhny M. (1960). The isolation of a crystalline active principle from *Nigella sativa* seeds. *J Pharm Sci UAR* (1), 9-19.
- ❖ Mahmood M.S., Gilani A.H., Khwaja A., Rashid A., Ashfaq M.K. (2003). The *in vitro* effect of aqueous extract of *Nigella sativa* seeds on nitric oxide production. *Phytotherapy research*. **17**: 921-924.
- ❖ Manou I., Bouillard L., Devleeschouwer M.J., Barel A.O. (1998). Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*. **84**: 368-376.

- ❖ Mariam A., Abu-Al-Basal. (2009). In vitro and in vivo anti-microbial effects of *nigella sativa* linn. seed extracts against clinical isolates from skin wound infection . American Journal of Applied Sciences 6(8): 1440-1447.
- ❖ Marzouk B., Marzouk Z., Décor R., Edziri H., Haloui E., Fenina N., and Aouni M., (2009). Antibacterial and anticandal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* schrad. From Medenine. *Journal of Ethnopharmacology*,125:344-349.
- ❖ Marzouk B., Marzouk Z., Décor R., Edziri H., Haaoui E., Fenina N., and Aouni M., (2010). Antibacterial and antifungal activities of several populations of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. Immature Fruits and seed. *Journal de Mycologie Médical*, 20:179-184.
- ❖ Mashhadian N.V., Rakhshandeh H. (2005). Antibacterial and antifungal effects of *Nigella sativa* extracts against *S.aureus*, *P. aeroginosa* and *C.albicans*. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. **21**: 47-52.
- ❖ Mazino M., Bersani C., Comi G. (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection*. **62**: 1017–1023.
- ❖ McCutcheon A.R., Roberts T.E., Gibbons E., Ellis S.M., Babiuk L.A., Hancock R.E., Towers G.H. (1995). Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 49: 101-110.
- ❖ Memon U., Brohi A.H., Waseemuddin S.A., Azhar I., Bano H. (2003). Antibacterial screening of *Citrullus colocynthis*. *Pakistan of the pharmaceutical sciences*; 16: 1-6.
- ❖ Meral I., Yener Z., Kahraman T., Mert N. (2001). Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver

- damage in experimentally- induced diabetic rabbits. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **48**: 539-599.
- ❖ Merfort I., Wray V., Barakat H., Hussein S.A.M., Nawwar M.A.M., Willuhn G. (1997). Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry*. **46**: 359-363.
 - ❖ Meziti A. (2009). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* mémoire Pour l'obtention du Diplôme de magister en biochimie applique Université El-Haj Lakhdar Batna, p. 21-32.
 - ❖ Moretti, A., D'Antuno, F.L., Elementi, S. (2004). Essential oil of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascene* L., seed. *Journal of Essential Oil Research* **16** : 182–183.
 - ❖ Morikawa T., Xu F., Kashima Y., Matsuda H., Ninomiya K., Yoshikawa M. (2004a) .Novel dollabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*. *Organic letters*. **6**: 869-872.
 - ❖ Morikawa T., Xu F., Ninomiya K., Matsuda H., Yoshikawa M. (2004b). Nigellamines A₃, A₄, A₅ and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. **52**: 494-497.
 - ❖ Morsi N.M. (2000) Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta microbiologica Polonica*. **49**: 63-74.
 - ❖ Musa D., Dilsiz N., Gumushan H., Ulakoglu G. & Bitiren M. (2004). Antitumor activity of an ethanol extract of *Nigella sativa* seeds. *Biologia, Bratislava*. **59**: 735-740.
 - ❖ Mutabagani A., El-Mahdy S.A. (1997). Study of the anti-inflammatory activity of *Nigella sativa* L. and thymoquinone in rats. *J Saudi Pharm*. **5**:110-113.

N

- ❖ Nadkarni K. (1976). *Crocus sativus*, *Nigella sativa*. In K.M. Nadkarni (Ed.). *Indian Materia Medica.*, pp. 386–411.
- ❖ Nagi M.N., Mansour M.A. (2000). Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats : a possible mechanism of protection. *Pharmacological research*. **41**: 283-9.
- ❖ Nair M.K.M., Vasudevan P., Venkitanarayanan K. (2005) Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. **16**: 395-398.
- ❖ Negre, R. (1962). *Petite flore des régions arides du Maroc occidental*, édition CRNS paris. T1, pp. 237-238.
- ❖ Nergiz C., Ünal K. (1991). Effect of the method of extraction on the total polyphenol and 1,2-diphenol content and stability of virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric*. **56**:79-84.
- ❖ Nergiz C., Otles S. (1993). Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Food Chemistry*: **48** : 259-61.
- ❖ 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.
- ❖ Nickavar B., Mojaba F., Javidniab K., Amolia M.A.R. (2003). Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Journal of biosciences*. **58**: 9-10.
- ❖ Nilsson L. (1978). New rapid bioassay of gentamicin based on luciferase assay of extracellular ATP in bacterial cultures. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **14**: 812-816.

Q

P

- ❖ Padmaa M.P. (2010). *Nigella sativa* Linn. - A comprehensive review. Indian Journal of Natural Products and Resources. Vol. 1(4), pp 409-429.

Q

R

- ❖ Raj Kapoor B., Anandan A., Jayakar B. (2002). Anti-ulcer effect of *Nigella sativa* Linn. against gastric ulcers in rats. *Current Science*. **82**: 177-179.
- ❖ Ramadan M. F., Mörsel J.T. (2002b). Direct isocratic normal-phase HPLC assay for fat soluble vitamins and β -carotene in oil seeds. *European food research and technology*. **214**: 521-527.
- ❖ Ramadan M. F., Mörsel J.T. (2003). Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oil seeds. *Food Chemistry*. **80**: 197-204.
- ❖ Randhawa M.A., Al-Akloby O.M., Al-jabre S.H.M., Al-qurashi A.M. and N. AKhtar. (2005). Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, inhibited *Fusarium solani*. *Pak. J. Med. Res.*, 44:1-3.

S

- ❖ Salem M.L. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. *International Immunopharmacology*. **5**: 1749-1770.
- ❖ Salim E.I., Fukushima S. (2003). Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutrition and cancer*. **45**: 195-202.
- ❖ Salman MT., Khan RA., Shukla I. (2008). Antimicrobial activity of Black Cumin seeds (*Nigella sativa*) against multi-Drug resistant strains of Coagulase negative Staphylococci. *Hippocratic J. Unani Med.*, 3:107-112.
- ❖ Saidi B. (2010). *La graine de Nigelle : remède sacré ou sacré remède?* Paris: Iqra et Les Quatres Sources.
- ❖ Salem M.L. (2005) Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. *International Immunopharmacology*. **5**: 1749-1770.
- ❖ Swamy S.M., Tan B.K. (2000) Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Ethnopharmacology*. **70**: 1-7.

T

- ❖ Tanis H., Aygan A and Digrak M. (2009). antimicrobial activity of four *nigella* species grown in southern turkey. *Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 11, No. 6.
- ❖ 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.
- ❖ Tenekoon K., Jeevathayaparan S., Kurukulasooria A., & Karunanayake E. (1991). Possible hepatotoxicity of *Nigella sativa* seeds and *Dregea volubilis* leaves. *J Ethnopharmacol* . **31**: 283-289.

- ❖ Thabrew M.I., Mitry R.R., Morsy M.A., Hughes R.D. (2005). Cytotoxic effects of a decoction of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* on human hepatoma HepG2 cells. *Life Sciences*. **77**: 1319-1330.
- ❖ Thippeswamy N.B., Akhilender N.K. (2005). Antioxidant potency of cumin varieties-cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. *European food research and technology*. **220**: 472-476.
- ❖ Tuter M., Aksoy H.A., Ustun G., Riva S., Secundo F., Ipekler S. (2003). Partial purification of *Nigella sativa* L. seed lipase and its application in hydrolytic reactions. enrichment of γ -linolenic acid from borage oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **80**: 237-241.

U

V

- ❖ Vonarburg B. (1998). Natürlich. (18), pp. 65-68.

W

X

Y

Z

- ❖ 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**: 127-136.
- ❖ Zaoui A., Cherrah Y., Mahassini N., Alaoui K., Amarouch H., & Hassar M. (2002). Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine* . **9** : 69-74.
- ❖ Zohary M. (1983). The genus *Nigella* (Ranunculaceae)-a taxonomic revision. Springer-Verlag.

BEA (gélose) (= gélose bile-esculine)

- Peptone tryptique.....17g
- Peptone pepsique de viande.....3g
- Extrait de levure.....5g
- Bile de bœuf déshydratée.....10g
- Chlorure de sodium.....5g
- Citrate de sodium.....1g
- Esculine.....1g
- Citrate de fer ammoniacal.....0,50g
- Azide de sodium.....0,25g
- Gélose.....13 g
- pH 7
- Autoclaver 15 minutes à 120 °C. Répartir en boites de pétri.

Gélose aucétrimide :

Pour 1 litre de milieu de base :

- Peptone pancréatique de gélatine20,0 g
- Cétrimide0,3 g
- Chlorure de magnésium1,4 g
- Sulfate de potassium10,0 g
- Agar bactériologique.....15,0 g
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.

Gélose chapman :

- Tryptone..... 5g
- Extrait de viande..... 3g
- Extrait de levure..... 3g
- Chlorure de sodium..... 7g
- Peptone bactériologique..... 10g
- Manitol..... 10g
- Rouge de phénol..... 0,05g
- Eau distillée qsp..... 1L
- PH = 7,4 à 37°C
- Préparation : 119g/L stérilisation à 121°C/15mn

Gélose Hektoen :

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande12,0 g
- Extrait autolytique de levure.....3,0 g
- Lactose12,0 g
- Saccharose12,0 g
- Salicine2,0 g
- Sels biliaires9,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Thiosulfate de sodium5,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal1,5 g
- Bleu de bromothymol65 mg
- Fuchsine acide40 mg

- Agar agar bactériologique13,5 g
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,6 ± 0,2.

Gélose Mac Conkey :

- Peptone.....20g
- Lactone.....10g
- Sels de bile.....5g
- Chlorure de sodium.....5g
- Rouge neutre.....0,075g
- Agar.....12g
- Eau distillée qsp.....1L
- PH = 7,4 (±0,2) à 37°C
- Préparation : 52g/L Stérilisation à 121°C/15mn

Gélose Mueller-Hinton :

- Extrait de viande.....4g
- Hydrolysate de caséine..... 17,5g
- Amidon..... 1,5g
- Agar..... 15g
- Eau distillée qsp..... 1L
- Préparation : 38g/L Stérilisation à 121°C/15mn

Gélose Mossel :

- Peptone.....10,0 g
- Extrait de viande.....1,0 g
- Mannitol.....10,0 g

- Jaune d'œuf.....à 20 % 10 %
- Sulfate de Polymyxine B.....0,01 g
- Rouge de phénol.....0,025 g
- Chlorure de sodium..... 10,0 g
- Agar14,0 g
- pH=7,2
- Préparation : 40 g /L Stérilisation à 121°C/15mn

Gélose nutritive :

- Extrait de viande.....1g
- Extrait de levure.....2g
- Peptone..... 5g
- Chlorure de sodium..... 5g
- Agar..... 15g
- Eau distillée qsp..... 1L
- PH = 7,2 (± 0,2) à 37°C
- Préparation : 28g/L (chauffage de la solution jusqu'à ébullition)
- Stérilisation à 121°C /15mn.

Gélose Sabouraud :

- Peptone.....10 g
- Glucose massé.....20 g
- Agar-agar.....15 g
- Eau distillée (qsp).....1000 ml
- vitamines et facteurs de croissance
- pH = 6,0
- L'addition de chlorure de triphényl 2-3-5-tétrazolium (TTC) (à 0,1 g/l)
- Stérilisation à 121°C/15mn

Bouillon nutritif :

- Extrait de viande.....3g
- Peptone.....5g
- Chlorure de sodium.....5g
- Eau distillée.....qsp 1L
- PH = 7,2 (±0,2) à 37°C
- Préparation : 9g/L Stérilisation à 121°C/15mn

Bouillon Cœur Cerveau (BHIB) :

- Protéose- peptone.....10g
- Infusion de cervelle de veau.....2,5g
- Infusion de cœur de bœuf5g
- Glucose.....2g
- Chlorure de sodium.....5g
- Hydrogénophosphate de sodium.....2,5g
- Eau distillé.....1000ml
- PH = 7,4 (±0,2) à 37°C

Bouillon Sabouraud :

- Tryptone.....5,0 g
- Peptone pepsique de viande.....5,0 g
- Glucose.....20,0 g
- Eau distillé.....1000ml
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 5,7 ± 0,2.

Eau Physiologique :

- Chlorure de sodium.....9g
- Eau distillée.....1000ml

A method of HPLC was applied for detected the components pharmacologically active: the thymoquinone (TQ), dithymoquinone (DTQ), thymohydroquinone (THQ), and thymol (THY), in the seeds oil of *Nigella sativa*.

The evaluation of the antibactérienne activity and antifongic of the oil of nigella L. and the oil of coloquinte, and seeks it of a possible interaction between these two oils.

Oils coming from the species *Nigella sativa* and *Citrullus colocynthis*, are tested on stocks of references: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10879, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Salmonella thyphimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebseilla pneumoniae* ATCC 700603, and *Candida albicans* ATCC 33210 by using the method of diffusion of the discs.

Only the oil of *Nigella sativa* presented an antimicrobial activity on three stocks (*S.aureus*, *B.cereus*, and *E.faecalis*) whose best inhibition was that on *S. aureus*. Thus no interaction was detected between various oils.

The fixed oil of *Nigella sativa*, seems to be effective on the bacteria of the Gram flora positive.

The thymoquinone and thymol present in the oil of nigelle are antimicrobial molecules which can be perceived like an excellent alternative to the uses of antibiotics, because the latter lose their effectiveness by the phenomenon of resistance of the bacteria.

Key words : *Nigella sativa*, Quinones, Thymoquinone, Dithymoquinone, Thymohydroquinone, Thymol, Chromatography with reversed phase, *Citrullus colocynthis*, fixed oil, antimicrobial activity.

Une méthode d'HPLC a été appliquée pour détecté les constituants pharmacologiquement actifs : la thymoquinone (TQ), dithymoquinone (DTQ), thymohydroquinone (THQ), et le thymol (THY), dans l'huile des graines de *Nigella sativa*.

L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile de nigelle et l'huile de coloquinte, et la recherche d'une éventuelle interaction entre ces deux huiles.

Les huiles provenant des espèces *Nigella sativa* et *Citrullus colocynthis*, sont testées sur les souches de références : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10879, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Salmonella thyphimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebseilla pneumoniae* ATCC 700603, et *Candida albicans* ATCC 33210 en utilisant la méthode de diffusion des disques.

Seule l'huile de *Nigella sativa* a montré une activité antimicrobienne sur trois Souches à gram positif (*S.aureus*, *B.cereus*, et *E.faecalis*) dont la meilleure inhibition était celle sur le *S. aureus*.

Aucune interaction n'a été détectée entre l'huile de nigelle et de coloquinte.

La thymoquinone et thymol présent dans l'huile de nigelle sont des molécules antimicrobiennes qui peuvent être perçue comme une excellente alternative à l'usages d'antibiotiques, parce que ces derniers perdent leurs efficacités par le phénomène de résistance des bactéries.

Mots clés : *Nigella sativa*, Quinones, Thymoquinone, Dithymoquinone, Thymohydroquinone, Thymol,

Chromatographie à phase renversée, *Citrullus colocynthis*, l'huile fixe, activité antimicrobienne.