

République Algérienne Démocratique et populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen

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

Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du Diplôme

Master

Option

Sciences des aliments

Par

M^{elle} BELABID Hafsa

Thème :

*Contribution à l'étude physicochimique de l'huile de
Nigella sativa (nigelle) et de son pouvoir antimicrobien*

Soutenu le : 10 /06/2014.



Devant le jury composé de :

M ^r . CHAABANE SARI D.	Professeur	Président
Mlle. DIDI A.	Maître assistante A	Examinatrice
M ^r LAZZOUNIH. A.	Maître de conférences A	Encadreur

Année Universitaire : 2013-2014

République Algérienne Démocratique et populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen

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

Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du Diplôme

Master

Option

Sciences des aliments

Par

M^{lle} BELABID Hafsa

Thème :

*Contribution à l'étude physicochimique de l'huile de
Nigella sativa (nigelle) et de son pouvoir antimicrobien*

Soutenu le : 10 /06/2014.



Devant le jury composé de :

M^r. CHAABANE SARI D. Professeur Président

Mlle. DIDI A. Maître assistante A Examinatrice

M^r LAZZOUNIH. A. Maître de conférences A Encadreur

Année Universitaire : 2013-2014

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ





Dédicaces

Louange à Dieu le tout puissant pour m'avoir aidé dans mes études,

Je dédie cet humble travail à ma plus belle source d'inspiration,

Le plus beau cadeau que le bon Dieu m'a offert,

Et à qui je dois tant, Mes parents,

A tous ceux qui veulent partager ma joie,

Je vous dédie ce travail,

Hafsa !



Remerciements

Je remercie tout d'abord Allah qui m'a donné la santé et le courage pour terminer ce mémoire.

Je tiens à présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à monsieur LAZZOUNI HAMMADI A., maître de conférences au département d'écologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université Abou-Bakr Belkaid de Tlemcen qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail.

Je remercie monsieur CHARBANE SARJ D., professeur à l'université Abou-Bakr Belkaid de Tlemcen et directeur du « laboratoire de produits naturels » d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires et d'avoir accepté de présider ce jury. Qu'il trouve ici mon profond respect.

Mes sincères remerciements vont également à mademoiselle DIDI A., maîtreassistante à l'université Abou-Bakr Belkaid de Tlemcen, pour ses discussions, ses conseils et ses encouragements. Je la remercie aussi pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie sincèrement toutes les personnes du laboratoire LAPRONA qui n'ont pas été citées pour la bonne ambiance de travail et l'entraide généralisée au sein de laboratoire.

Enfin, je remercie sincèrement toutes les personnes qui m'ont aidé et encouragé pour l'aboutissement de ce travail (M^r. Rebiahi, Salime, Yasser, Abdeldjelil, Wafaa...ect.)

A vous tous, un grand merci.



ملخص

اهتمام الانسان بالدهون وكيفية استخدامها يعود لزمان بعيد حيث استخدمها في: الصناعات الغذائية، التجميل، الطب... الخ. عدة بنور هي

مصدر لزيوت قيد دراسة خصائصها العلاجية و المغذية.

في دراستنا، اهتمنا باستخلاص الزيت الثابتة لبذور *Nigella sativa* المسماة *nigelle*.

في الجزء الأول من عملنا، ندرس بعد استخلاص الزيت خصائصها الفيزيائية والكيميائية. مقارنة معايير بعض زيوت الطعام مع المذكورة في البحث المكتبي و عينتنا أعطت 0,911 كثافة نسبية، معامل الانكسار منخفض 1,467، معامل حموضة 1,47%، معامل اليود 119,63 غ/100 غ من الزيت، معامل البيروكسيد 7 موز/0 كغ و معامل التصين 205,57. كل هذه النتائج موافقة للمعايير زيت *Nigelle* لها. مكونات كيميائية غنية تجعلها مهمة.

الجزء الثاني يدرس النشاط المضاد للبكتيريا لزيت *Nigelle* من هذه النقطة الزيت لا تحتوي على أي نشاط فيما يخص

Enterococcus faecalis و *Candida albicans*. لكن كانت لها نشاط متوسط على باقي البكتيريا المدروسة.

زيوت **الكلمات المفتاحية:** *Nigella sativa*, الخصائص المغذية و العلاجية، الخصائص الفيزيائية و الكيميائية، التركيبة الكيميائية،

النشاط المضاد للبكتيريا.

Résumé

De tout temps, l'homme s'est intéressé aux lipides diverses utilisations comme : l'agroalimentaire, la cosmétologie, la médecine,... etc. De nombreuses graines sont sources d'huiles qui sont de plus en plus étudiées pour leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'extraction de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa*, communément appelée nigelle.

Dans la première partie de ce mémoire, nous abordons, après extraction, les différentes caractéristiques physico-chimiques de l'huile. La comparaison des paramètres de certaines huiles alimentaires avec ceux de nigelle cités dans la littérature et notre échantillonnage a donné une densité relative (0,911), un faible indice de réfraction (IR=1,467), un indice d'acide (IA=1,470%), un indice d'iode (II= 119,63 g/100g d'huile), un indice de peroxyde (IP=7 meqO₂/kg) et un indice de saponification (IS=205,57). Toutes ces valeurs sont des valeurs en accord avec celles des normes. L'huile de nigelle a une composition chimique riche qui pourrait la rendre très intéressante.

La deuxième partie traite de l'évaluation de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) de l'huile de nigelle. De ce point de vue, l'huile de nigelle ne présente aucune activité antimicrobienne vis-à-vis des deux souches *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans*. Par contre, elle a eu une activité modérée vis-à-vis des autres souches testées.

Mots clés : Huiles de *Nigella sativa*, caractéristiques physico-chimiques, composition chimique, activité antimicrobienne.

Abstract

Always, the man was interested in lipids diverse uses as: the food-processing industry, the beauty care, the medicine, etc. Numerous seeds are sources of oil which are more and more studied for their nutritional and therapeutic properties.

In our work, we were interested in the extraction of the fixed oil of the seeds of *Nigella sativa*, collectively called nigelle.

In the first part of this report, we land, after extraction, the various physico-chemical characteristics of the oil. The comparison of the parameters of certain edible oils with those of nigelle quoted in the literature and our given sample a relative density (0,911), a low(weak) refractive index (IR=1,467), an indication(index) of acid (IA=1,470 %), an indication(index) of iodine (II = 119,63 g / 100g of the oil), an indication(index) of peroxide (IP=7 meqO₂ / kg) and an indication(index) of saponification (IS=205,57). All these values are values in agreement with those of the standards. The oil of nigelle has a rich chemical composition which could make her (it) very interesting.

The second part handles with the evaluation of the antimicrobial activity (antibacterial and antifungal) some oil of nigelle. From this point of view, the oil of nigelle presents no antimicrobial activity saw - in - screw of both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. On the other hand, it had a moderated activity screw - in - screw of the other tested stumps.

Keywords: oil of *Nigella sativa*, physico-chemical characteristic, chemical composition, antimicrobial activity.

Table des Matières

Liste des abréviations.....	i
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures.....	v
Liste des photos.....	vi
Introduction générale.....	1
Première partie : Etude bibliographie	
Chapitre 1 : Présentation de la plante	
I.1. Généralités.....	6
I.2. Historique.....	6
I.3.Effets thérapeutiques de <i>N. sativa</i> L.....	7
I.4. Description botanique.....	8
I.5.Culture.....	10
I.5.1.Répartition	10
I.5.2. Conditions de culture	11
I.5.3. Rendement de production de graines de <i>Nigella sativa</i>	11
I.6. Usage à travers le monde.....	11
Chapitre2 : Composition chimique des graines de nigelle	
II.1.Composition générale de la graine.....	13
II.1.1.Minéraux.....	13
II.1.2.Vitamines.....	14
II.1.3.Protéines.....	15
II.2.Composition chimique de l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i>	15
II.2.1 .Composition générale de l'huile fixe.....	15
II.2.2.Caractéristiques physico-chimiques de l'huile fixe.....	17
II.3. Toxicité de <i>N. sativa</i>	19

Deuxième partie : Etude expérimentale

I. Extraction de l'huile de nigelle.....	21
I.1. Matériel végétal.....	21
I.2. Extraction de l'huile et la détermination de la teneur en matière grasse.....	21
I.3. Expression des résultats.....	22
II. Analyses physico-chimiques de l'huile de nigelle.....	23
II.1. Densité relative à 20 °C.....	23
II.2. Indice de réfraction à 20 °C.....	24
II.3. Indice d'Acide.....	25
II.4. Indice d'Iode.....	26
II.5. Indice de saponification	27
II.6. Indice de peroxyde	28
III. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile de nigelle.....	30
III.I. Matériel.....	30
III.I.1. Matériels biologique.....	30
III.I.2. Milieux de culture et solutions de dilutions (Annexes).....	31
III.II. Méthodes.....	31
III.II.1. Isolement et purification.....	31
III.II.2. Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile de nigelle.....	32
III.II.2.1. Méthode de diffusion des disques (contact indirect).....	32
III.II.2.2. Méthode des puits	32

Troisième partie : Résultats et discussion

I. Extraction de l'huile.....	35
I.1. Mode de séchage des graines.....	35
I.2. Temps d'extraction.....	35
I.3. Rendement en huile.....	36
I.4. Mode de conservation de l'huile de nigelle.....	36
II. Analyses physico-chimiques de l'huile de nigelle.....	37
II.1. Densité.....	37
II.2. Indice de réfraction.....	38
II.3. Indice d'acide	38
II.4. Indice d'iode.....	39
II.5. Indice de saponification.....	39
II.6. Indice de peroxyde.....	40
II.7. Récapitulatif des résultats.....	40
II.8. Comparaison de la composition chimique de l'huile de nigelle avec les autres huiles analysées (coloquinte et olive).....	41
III. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile de nigelle.....	45
III.1. Isolement et purification.....	45
III.2. Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile de nigelle.....	48
III.2.1. Méthode de diffusion des disques (contact indirect).....	48
III.2.2. Méthode des puits	51
Conclusion générale.....	58
Références bibliographiques.....	61

Annexes

Liste des abréviations

N. sativa : *Nigella sativa*

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

PL : Phospholipides

méq : milliéquivalents

GGT: α -glutamyl transférase

ALAT : Alanine aminotransférase

DL50 : La dose létale médiane

ASAT: Aspartate aminotransférase

ISO: International Organization of Standardization

Rdt :Rendement en pourcentage

AFNOR : Association Française de Normalisation

EN : Norme Européenne

N : Normalité

FFA: Free Fatty Acids

R : Indice de Réfraction

IA: Indice d'Acide

II : Indice d'Iode

IS : Indice de Saponification

IP :Indice de Peroxyde

T : Température

NF : Norme Française

UV: Ultra-violet

bp : « boiling point »

h : heure

ATCC : Américain Type Culture Collection

EIA : Esculine Iron Agar

GNI : Gélose Nutritive Inclinée

BN : Bouillon Nutritif

BHIB : Bouillon Coeur Cerveau

C. albicans : *Candida albicans*

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

SM : Spectrométrie de Masse

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

UFC : Unité Format la Colonie

DO : densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

E. faecalis : *Enterococcus faecalis*

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

ZD : Zone d'inhibition

MD : Méthode de disque.

MP : Méthode des puits.

AGT : Acide Gras totaux

SAMR : *Staphylococcus aureus* Résistance à la Mériciline

H. pylori : *Helicobacter pylori*

G : Gram

C. jejuni : *Campylobacter*

mn : Minute

Liste des tableaux

Tableau n° 1: Composition générale des graines de <i>Nigella sativa</i>	P13
Tableau n°2: Composition minérale des graines de <i>Nigella sativa</i>	P14
Tableau n°3: Teneur en vitamines et valeurs nutritionnelles des graines	P15
Tableau n°4: Principaux phospholipides d'huile fixe de <i>Nigella sativa</i>	P16
Tableau n° 5: Propriétés physiques et chimiques de l'huile de graines	P18
Tableau n° 06 : Nature et origine du matériel biologique utilisé.....	P30
Tableau n°7 : Milieux de culture spécifiques pour l'isolement et la croissance des différentes souches de référence.....	P32
Tableau n° 08 : Résultats des analyses physico-chimiques de l'huile de nigelle.....	P37
Tableau n° 09: Valeurs comparatives des paramètres physico-chimiques des trois huiles analysées.....	P41
Tableau n°10 : Composition chimique des trois huiles analysées.....	P42
Tableau n°11 : Aspect général des souches sur les différents milieux utilisés.....	P48

Liste des figures

Figure n° 1 : <i>Nigella sativa</i> L. plante entière	P5
Figure n°2 : Aspect morphologique de la plante <i>Nigella sativa</i>	P9
Figure n°3 : Schéma de l'Extracteur Soxhlet	P22

Liste des photos

Photo n°1 : Huile de nigelle.....	P36
Photo n° 02 : Aspect de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur gélose Mueller –Hinton.....	P 45
Photo n° 03 : Aspect de <i>Bacillus subtilis</i> sur gélose nutritive.....	P 46
Photo n° 04 : Aspect d' <i>E. coli</i> sur gélose Mac conkey.....	P46
Photo n°05 : Aspect d' <i>Enterococcus faecalis</i> sur gélose EIA.....	P46
Photo n° 06 : Aspect de <i>S. aureus</i> sur gélose Chapman.....	P47
Photo n°07 : Aspect de <i>C. albicans</i> sur gélose Sabouraud.....	P47
Photo n°08 : ZD de l'huile de nigelle sur <i>E. coli</i> (MD).....	P49
Photo n°09 : ZD de l'huile de nigelle sur <i>B. subtilis</i> (MD).....	P49
Photo n°10 : ZD de l'huile de nigelle sur <i>S. aureus</i> (MD).....	P49
Photo n°11 : ZD de l'huile de nigelle sur <i>P. aeruginosa</i> (MD).....	P50
Photo n° 12 : Aspect d' <i>E. faecalis</i> en présence de l'huile de nigelle (MD)	P50
Photo n° 13 : Aspect de <i>C. albican</i> en présence de l'huile de nigelle (MD).....	P50
Photo n°14 : ZD de l'huile de nigelle sur <i>E. coli</i> (MP).....	P51
Photo n°15 : ZD de l'huile de nigelle sur <i>B. subtilis</i> (MP).....	P52
Photo n°16 : ZD de l'huile de nigelle sur <i>S. aureus</i> (MP).....	P52
Photo n°17 : ZD de l'huile de nigelle sur <i>P. aeruginosa</i> (MP).....	P52
Photo n° 18 : Aspect d' <i>E.faecalis</i> en présence de l'huile de nigelle (MP).....	P53
Photo n° 19 : Aspect de <i>C. albican</i> en présence de l'huile de nigelle (MP).....	P53

Introduction générale

La quête des remèdes au sein du règne végétal date de plusieurs millénaires. Grâce à la transmission orale des savoirs, l'écriture a grandement contribué au transfert entre des générations des connaissances empiriques sur les plantes médicinales (**Boublenza, 2011**).

Depuis le XIX siècle, les scientifiques s'appliquent à isoler des molécules responsables de l'activité thérapeutique des plantes. En 1999, neuf des vingt médicaments les plus vendus provenaient d'extraction végétale (**Boulatika et Habis., 2012**).

Des centaines de plantes sont connues pour leurs vertus thérapeutiques et suspectées d'avoir maintes propriétés biologiques, pouvant être ainsi ; hypoglycémiques, immunostimulantes, anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-tumorales, antimicrobiennes, etc. (**Sirois ,2008**).

Les agents antimicrobiens utilisés de nos jours sont généralement des dérivés de l'industrie chimiqueet, leur large distribution et emploi, posent un autre problème, à savoir celui des effets néfastes sur l'environnement, la santé humaine et l'acquisition d'une résistance microbienne au cours du temps (**Boulatika et Habis., 2012**).

Cependant, le développement et l'acquisition de la résistance bactérienne envers les antibiotiques est devenu un sujet d'inquiétude et une préoccupation des scientifiques. Il faut ajouter à cela, les problèmes des moisissures et des mycotoxines envers les denrées alimentaires. En effet en plus de leur effet nuisible sur la santé humaine, elles causent de lourdes pertes économiques (**Boulatika et Habis., 2012**).

Ainsi le développement de nouvelles molécules antimicrobiennes est devenu une haute priorité dans la recherche biomédicale. La recherche actuelle s'oriente donc, vers l'exploitation des substances naturelles, et parmi lesquelles figurent les huiles qui occupent une place importante dans le monde ; les trois quarts de la production sont destinés à l'alimentation, le reste se partage entre les applications industrielles, pharmaceutiques et cosmétiques(**Boublenza, 2011**).

C'est dans cette perspective que nous nous sommes intéressés à l'analyse physicochimique et à l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile de nigelle (*Nigella sativa*), plante réputée pour son usage en médecine traditionnelle et ses vertus thérapeutiques diversifiées (fébrifuge, anti-infectieuse, antibactérienne, hypotensive, hypoglycémiant) (Boublenza, 2011).

Dans le but de trouver de nouvelles activités antimicrobiennes, l'huile végétale de la plante précédemment citée a été testée sur des souches bactériennes de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram⁺) ; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Gram⁺) ; *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram⁻) ; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Gram⁺) ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram⁻) et *Candida albicans* ATCC 33210.

L'objectif et le but de cette étude consistent à comparer l'espèce : *Nigella sativa* avec les deux autres espèces (*Olea europaea* et *Citrullus colocynthis*) par une étude physicochimique et de mettre en évidence leurs potentiels thérapeutiques par l'évaluation de l'activité antimicrobienne qu'elles contiennent.

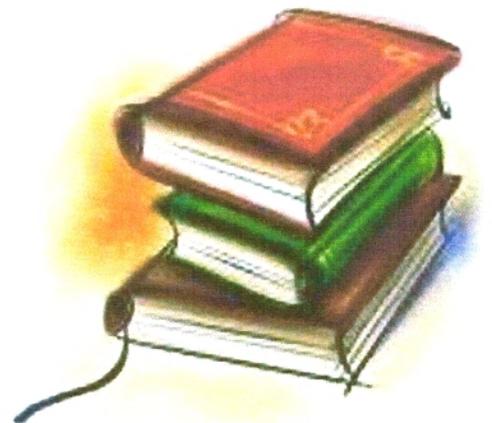
Ce travail est divisé en trois parties:

- ✓ **La première partie**, nous la consacrons à une étude bibliographique sur la présentation de la plante étudiée ;
- ✓ **Dans la deuxième partie**, nous aborderons la description du protocole expérimental utilisé ;
- ✓ **La troisième partie**, consiste à interpréter et discuter les résultats expérimentaux obtenus.



Première partie:

Etude bibliographique



Chapitre 1:

Présentation de la plante étudiée



Figure n°1 : *Nigella arvensis* L. plante entière (Fabienne, 2005).

I.1. Généralités

Du latin *nigellus* "noirâtre", 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, *Sinoudj* en Algérie (**Ghedira, 2006**).

Nigella sativa est une plante herbacée appartenant à la famille des Renonculacées (**Guignard, 2001**). C'est une herbe originaire du moyen orient, de l'Extrême-Orient (**Ghazanfar et Al-Sabahi, 1993**), 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 utilisée 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**).

Sa popularité 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)**; « *El habbah sauda est un médicament pour toutes les maladies sauf la mort* ». 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**).

Elle est aussi citée dans certains livres sacrés ainsi que dans le traité des simples d'Hippocrate. Dioscoride, 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. Claude Galien conseille de les brûler pour tuer les moucheron et les moustiques et Jérôme Bock (Tragus) les employait comme antihelminthiques (**Benhaddou, 2009**).

I.3.Effets thérapeutiques de *N. sativa* L

Plusieurs études ont été conduites, en particulier pendant les deux dernières décennies sur l'effet des extraits des graines de *N. sativa* sur les divers systèmes du corps in vitro ou in vivo (**Ait Mbareket al., 2007**).

Les investigations pharmacologiques sur les extraits de graines indiquent un large éventail des activités allant d'une amélioration de la réponse immunitaire (**Medinica et al., 1994**) jusqu'à un effet antihistaminique (**Mahfouz et al., 1965 ; Kanter et al., 2006**), antidiabétique (**Al-Haderet al., 1993**), anti-hypertensif (**El Tahiret al., 1993**) et atteignant même un effet antioxydant (**Ramadan, et Mörsel, 2004**) anti-tumoral (**Ait Mbareket al., 2007**) et anti-inflammatoire (**Houghton et al., 1995 ; Al-Ghamdi 2001**).

Cette activité peut englober un effet anti-ulcéreux (**Rajkapooret al., 2002**) et même une action antimicrobienne (**El-Alfyet al., 1975 ; Arici et al., 2005**). Plusieurs de ces activités ont été attribuées aux constituants de quinones de la graine (**Mahfouzet al., 1960 ; Ali et al., 2003**).

I.4. Description botanique

Nigella sativa est une plante annuelle herbacée atteignant 30 à 60 cm de haut. Les feuilles pennatiséquées, divisées en lobes étroits, 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 petites à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes présentant de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle (**Ghedira, 2006**).

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 s'ouvrent et l'exposition des graines à l'air les rend noire. Ces graines sont ovoïdes de 2 à 3.5mm et présentent 3 à 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée (**Ghedira, 2006**).

La famille des Renonculacées est l'une des grandes familles des Angiospermes avec une trentaine de genres et environ 1200 espèces (**Negre, 1962**).



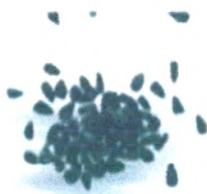
Fleur e



Graines de *N. sativa* (Padmaa, 2010)



Capsule



Graines

Sous règne Comophyte
Supra embranchement Rhizophyte
Embranchement Spermaphyte
Sous embranchement Angiosperme
Classe Eudicotyledone
Sous classe Audicotx archaïques
Ordre Ranunculales
Famille Renonculacées
Sous famille Hellobotoïdées
Genre *Nigella*
Espèce *Nigella sativa*

(Gugnard, 2001)

Figure n°2 : Aspect morphologique de la plante *Nigella sativa* (Meziti, 2009).

I.5.Culture

I.5.1.Répartition

Nigella sativa est une plante très largement cultivée en dehors de l'Europe : en Russie, Turquie, Egypte, Arabie saoudite, Ethiopie, Afrique du nord, Syrie, dans les Balkans, en Moyen et Extrême Orient, Inde, Bangladesh, au Sri Lanka (**Slimane, 2001**). Le principal pays producteur est l'Egypte. En France elle peut être exceptionnellement présente dans la région méditerranéenne (**Wichtl et al., 2003**).

I.5.2. Conditions de culture

Les semis doivent se faire en place car la nigelle n'aime pas être déplacée. Il faut semer en lignes espacées de 30 cm, en plein soleil, dans un sol riche et bien drainé. La germination se fait en 10 à 15 jours. La nigelle fleurit en Juin-Juillet. Les graines peuvent être récoltées en Août. En laissant monter en graines quelques fleurs, de nouveaux plants apparaissent pendant des années. Il faut néanmoins veiller à supprimer les fleurs fanées au fur et à mesure pour prolonger l'épanouissement (**Burtej ,1992**) ;(**Cheers, 1997**) ;(**Reylli, 2003**).

I.5.3. Rendement de production de graines de *Nigella sativa*

Une étude montre l'influence de la plantation à trois dates différentes de *Nigella sativa* et ses répercussions sur la production des graines (rendement, quantité, poids, densité, germinabilité) et sur leur contenu en huile essentielle. Ces dates sont, pour *Nigella sativa* : le 3 mars, le 9 avril et le 7 mai ; les récoltes ont lieu, respectivement : le 19 juillet, le 25 juillet et le 1er août. L'étude montre que le cycle de croissance est court mais qu'en général, une plantation plus précoce engendrera une plus grande production de graines par plante d'où un rendement plus important (**D'Antuonol et al. 2002**).

Néanmoins, la courte phase végétative reste un facteur limitant quant à la quantité de graines produites et des études plus approfondies seraient nécessaires pour augmenter le pouvoir de germination et accroître le cycle végétatif (**D'Antuonol et al. 2002**).

I.6. Usage à travers le monde

En plus de leur effet thérapeutique, les graines de nigelle entières ou moulues sont utilisées aussi comme épice. Elles servent à saupoudrer le pain et les pâtisseries, les plats sucrés, les fromages, les sauces et les soupes pour les rendre plus appétissants. Elles entrent aussi dans la composition du « ras el hanout », un mélange de 24 à 27 épices utilisé pour aromatiser les soupes (Vonarburg, 1998).

Chapitre II:

Composition chimique des graines de nigelle

II.1.Composition générale de la graine

Une analyse a été réalisée sur des graines de nigelle de Turquie en 1993 (Nergiz, 1991).
Le tableau n°1 résume ces valeurs.

Tableau n° 1: Composition générale des graines de *Nigella sativa* ((Nergiz, 1991).

Composition	Teneur en %
Eau	6,4
Cendres	4,0
Lipides	32,0
Protéines	20,2
Fibres	6,6
Glucides	37,4

La composition générale des graines de *Nigella sativa* montre une teneur relativement importante en glucides (37,4%), en lipides avec 32% et surtout en protéines avec 20%(Nergiz, 1991).

Les graines de *Nigella sativa* étant très utilisées dans l'alimentation, ces données permettent déjà de lesqualifier comme ayant une bonne valeur nutritive (Nergiz, 1991).

II.1.1.Minéraux

L'analyse minérale a été réalisée par spectrophotométrie par absorption atomique sur des graines de nigelle provenant de 4 pays différents : Inde (1 échantillon), Syrie (2 échantillons), Turquie (1 échantillon) et Jordanie (1 échantillon) (Tavruri et al. ; 1998).

Les résultats sont regroupés dans le tableau n°02.

Tableau n°2:Composition minérale des graines de *Nigella sativa*(Takruri et al. ; 1998)

Composition	Teneur en mg/100g
Potassium	527,70 ± 47,70
Phosphore	526,50 ± 30,16
Sodium	49,60 ± 6,13
Fer	10,50 ± 1,56
Zinc	6,04 ± 0,38
Calcium	185,90 ± 18,27
Cuivre	1,84 ± 0,34

La graine de nigelle présente une teneur intéressante en fer, zinc et phosphore. Une autre étude confirme l'absence de métaux lourds (cadmium, plomb et arsenic) (Al-Jassir, 1992).

II.1.2. Vitamines

En 1998 en Jordanie (Takruri et al. ; 1998), l'étude de la teneur en vitamines a été menée sur 5 échantillons de graines de *Nigella sativa* provenant de 4 pays différents répartis comme suit :

- 1 échantillon d'Inde
- 2 échantillons de Syrie
- 1 échantillon de Turquie
- 1 échantillon de Jordanie

L'analyse a été réalisée par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP), d'après la méthode AOAC 1984 (Association of Official Analytical Chemists).

Le tableau n°03 donne la valeur moyenne des 5 échantillons.

Tableau n°3 : Teneur en vitamines et valeurs nutritionnelles des graines (Tacruri et al. ; 1998)

Vitamines	Teneur moyenne en mg/100g	AQR ^a en mg	% d'AQR ^b
Thiamine (B1)	1,500	1,5	100,0
Riboflavine (B2)	0,100	1,7	5,9
Pyridoxine (B6)	0,500	2,0	25,0
Niacine (B3)	5,700	20,0	28,5
Acide folique (B9)	0,061	0,4	15,3

^a AQR : Apports Quotidiens Recommandés aux Etats-Unis.

^b % d'AQR : Pourcentage d'Apports Quotidiens Recommandés (aux Etats-Unis).

Les teneurs en vitamines B sont intéressantes, notamment celle en vitamine B1 avec 100% des AQR ; en vitamine B3 avec 28,5% des AQR et en vitamine B6 avec 25% des AQR et surtout la vitamine E.

II.1.3. Protéines

Les graines de *Nigella sativa* contiennent environ 20% de protéines (Nergiz, 1991) c'est une teneur très importante puisqu'une proportion de 16% (caséine) est une valeur maximale.

II.2. Composition chimique de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa*

II.2.1 .Composition générale de l'huile fixe

Selon El-Tahir et Bakeet (2006), l'analyse chimique d'huile totale de *N. sativa* indique la présence d'huile fixe et d'huile essentielle. Le composant principal est l'huile fixe tandis que l'huile essentielle s'est étendue de 0,4-0,7% du poids des graines.

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% (Tableau n°04) (Ramadan et Mörsel, 2002).

L'analyse des phospholipides (PL) par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) a permis d'identifier principalement sept constituants qui sont regroupés dans le tableau n°04 ;

Tableau n°4: Principaux phospholipides d'huile fixe de *Nigella sativa*.

Constituants phospholipidiques	% des PL
phosphatidyl choline	46
phosphatidyl éthanolamine	25
phosphatidyl sérine	12
phosphatidyl inositol	9.56
lysophosphatidyl choline	4.23
phosphatidyl glycérol	1.51
Lysophosphatidyl éthanolamine	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 phytochimique de deux variétés des graines de *Nigella 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, eicosénoïque, behénique, lignocérique a été également détectée (**Nickavar et al., 2003 ; Cheikh-Rouhouet et al., 2007**).

Ultérieurement **Cheikh-Rouhouet et al., (2008)**, ont mis en évidence la richesse de l'huile de lanigelle 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 -stigmastérol, Δ^7 -

avenasterol et le cholestérol qui sont également détectés mais à des taux plus faibles (**Ramadan et Mörsel, 2002**).

II.2.2. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile fixe

Dans certains cas l'huile est dite huile fixe ou huile grasse.

Parmi les lipides on distingue :

- ❖ **Lipides simples** : acides gras et esters d'acides gras et d'un alcool (monoacylglycérols, diacylglycérols et triacylglycérols) ;

- ❖ **Lipides complexes** : phospholipides et glycolipides (qui sont aussi des lipides polaires) (**Bassim atta, 2003**).

L'extraction de l'huile se fait après broyage des graines par pression ou à l'aide d'un solvant organique (**Bassim atta, 2003**).

Les caractéristiques physico-chimiques ont été déterminées d'après la méthode AOAC sur des graines de *Nigella sativa* égyptiennes en 2003. L'huile a été extraite des graines broyées par éther de pétrole à l'aide d'un appareil de Soxhlet (**Bassim atta, 2003**).

L'huile obtenue par pression à froid est de couleur jaune doré, alors que celle extraite par solvant est jaune brunâtre. Ceci serait dû à la capacité du solvant à extraire les pigments liposolubles et les oléorésines présents dans les graines de nigelle (**Bassimatta, 2003**).

Le tableau n°05 résume les caractéristiques citées ci-dessus.

Tableau n° 5 : Propriétés physiques et chimiques de l'huile de graines (Bassim atta, 2003).

Indice de réfraction (à 20°C)	1,4721 ± 0,0002
Point de fusion (en °C)	- 3,3 ± 0,6
Densité relative (g/cm³)	0,921 ± 0,0002
Indice d'iode (g d'iode/100g d'huile)	128 ± 21
Indice de saponification (en mg de KOH/g d'huile)	203 ± 3
% de matière insaponifiable	1,8 ± 0,3
Indice de peroxydation (mécq O₂/kg d'huile)	10,7 ± 0,4

❖ **Indice d'iode** : est la masse d'iode moléculaire (en g) nécessaire pour saturer les doubles liaisons de 100g de lipides ; il est donc un reflet de l'insaturation des chaînes d'acide gras. Il donne aussi des indications sur l'instabilité de l'huile par peroxydation des doubles liaisons (Bruneton, 1999) ; (Harbone, 1998).

❖ **Indice de saponification** : est la masse d'hydroxyde de potassium (en mg) nécessaire pour saponifier les acides gras (neutraliser les acides gras libres) contenus dans 1g de lipides selon la réaction suivante (Bruneton, 1999) ; (Harbone, 1998) :



❖ **Pourcentage de matière insaponifiable** : est de 1,8%. La réaction de saponification permet de séparer la fraction insaponifiable qui contient : caroténoïdes, stérols, tocophérols, alcools terpéniques et hydrocarbures (**Bruneton, 1999**) ; (**Harbone, 1998**).

❖ **Indice de peroxydation** : exprime en milliéquivalents d'oxygène actif, la quantité de peroxyde contenue dans 1kg de substance. Il donne une idée de la stabilité de l'huile étudiée (**Bruneton, 1999**) ; (**Harbone, 1998**).

II.3. Toxicité de *N. sativa*

La toxicité de la nigelle est bien connue par les scientifiques. En effet, elle n'est utilisée qu'à faible dose, que ce soit par voie interne, externe, en fumigation ou en inhalation. Un surdosage des graines de *N. sativa* peut être mortel (**Boudjemaa et al., 2010**).

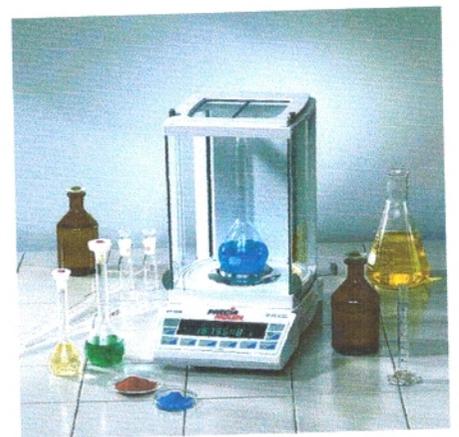
Dans une étude (**J. Bellakhdar, 1978 in MEZITI, 2009**) a rapporté que le surdosage thérapeutique peut provoquer des d'avortements. Cette toxicité, comme celles de la plupart des espèces de la famille des renonculacées, est due essentiellement à la présence de forte quantité de saponines et d'alcaloïdes dans les graines de nigelle. Mahfouz et collaborateurs en 1965, et ensuite Tenekoon et collaborateurs en 1991, ont étudié la toxicité des extraits aqueux et alcooliques de *N. sativa*. Les concentrations plasmatiques de α -glutamyl transférase (GGT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) ont été augmentées chez le rat après un traitement oral durant 14 jours; cependant aucune anomalie histologique n'a été observée chez ces rats (**Tenekoon et al., 1991 in MEZITI, 2009**). Zaoui et collaborateurs ont rapporté que les huiles fixes présentent un DL50 de 28,8 ml/kg et 2,06 ml/kg. 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'aspartateaminotransférase (ASAT).

(**Zaoui et al., 2002 in 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**).



Deuxième partie:

Etude expérimentale



Le travail qui fait l'objet de ce mémoire a été réalisé au laboratoire des produits naturels au département de biologie de l'Université de Tlemcen.

Dans cette partie, nous décrivons le matériel et les méthodes générales utilisés lors des protocoles expérimentaux.

Aujourd'hui la découverte de nouvelles sources naturelles d'origines végétales reste capitale pour leur utilisation comme de nouveaux remèdes thérapeutiques.

L'étude phyto-chimique qui consiste à détecter et à doser certains principes actifs existant dans la plante, permet de déterminer ces composés chimiques grâce à des techniques modernes. Ces derniers peuvent servir non seulement au développement de phytothérapie mais aussi à la découverte de nouvelles ressources de matériaux économiques tels que les huiles qui sont des précurseurs de synthèse des substances chimiques complexes.

I. Extraction de l'huile de nigelle

I.1. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur *Nigella sativa*. Les graines ont été achetées en épicerie. Après rinçage et séchage à l'obscurité, les graines ont été réduites en poudre à l'aide d'un broyeur à mortier et conservées à l'abri de la lumière pour des analyses ultérieures.

I.2. Extraction de l'huile et détermination de la teneur en matière grasse

Le protocole d'extraction suivi est la méthode normalisée de Soxhlet (figure n°3) décrite par AFNOR en ISO 659 (1998). Une masse de 10g de broyat est pesée dans une cartouche d'extraction bouchée avec du coton dégraissé et disposée dans l'appareil d'extraction.

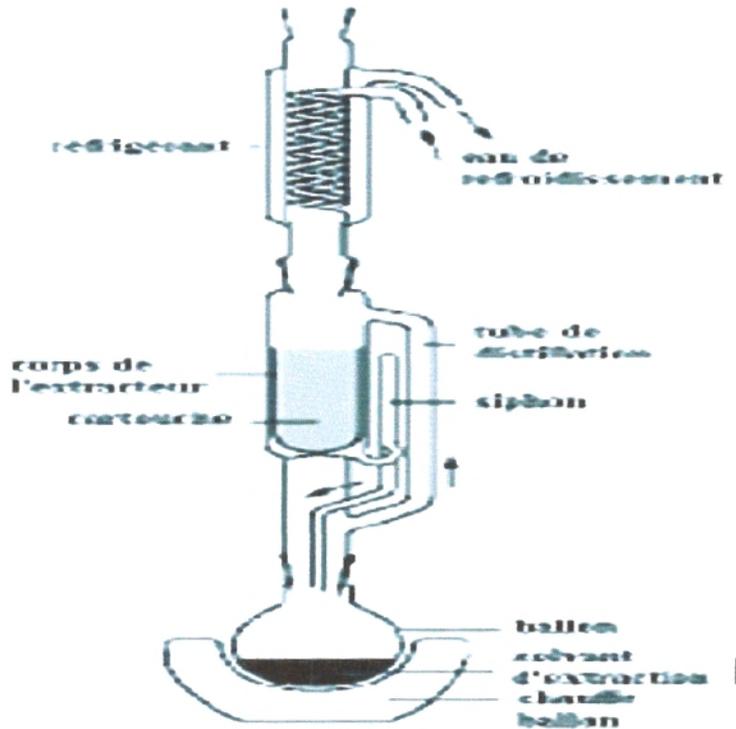


Figure n°3 : Schéma de l'extracteur Soxhlet

La quantité totale du solvant ajoutée doit être de une et demi à deux fois la capacité du réservoir à siphon d'extraction de l'appareil.

L'avantage dans ce procédé est que le solvant condensé s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute (Haidara, 1996).

I.3. Expression des résultats

Les extractions se sont déroulées sur 6 heures et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la matière initiale après pesée d'un ballon, préalablement taré, ayant subi une évaporation du solvant.

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$Rdt = m_o / m_i \times 100$$

Où :

m_o : Masse en grammes de l'huile évaporée ;

m_i : Masse en grammes de la prise d'essai (les graines broyées).

L'inconvénient dans cette méthode est qu'elle est longue et peu économique en solvant.

II. Analyses physico-chimiques de l'huile de nigelle

II.1. Densité relative à 20 °C (NF ISO 6883)

La densité relative d'une huile est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à la même température.

La densité relative est mesurée par une suite de pesées à l'aide d'un pycnomètre.

Après nettoyage et séchage du pycnomètre, il a été pesé et rempli d'eau distillée récemment bouillie et refroidie puis plongé dans un bain d'eau jusqu'à ce que l'eau atteigne une température de 20 °C.

Le pycnomètre a été retiré, essuyé extérieurement et pesé.

La même procédure est suivie pour l'huile en remplissant le pycnomètre par le même volume d'huile puis placé dans le bain d'eau pour qu'elle atteigne les 20°C. Ensuite, le pycnomètre est essuyé et pesé.

La densité relative se détermine par :

$$D^{20} = m_2 - m_o / m_1 - m_o$$

Où :

m_o : masse du pycnomètre vide ;

m_1 : masse du pycnomètre rempli d'eau distillée ;

m_2 : masse du pycnomètre rempli d'huile.

II.2. Indice de réfraction à 20 °C (ISO 6320)

L'indice de réfraction est mesuré à l'aide de réfractomètre de type Abbe thermostaté. Il est lié à la température et est mesuré à 20°C pour les huiles fluides et à 40 °C pour les graisses (Ollé, 2002).

Cet indice est déterminé à l'aide d'une lampe à vapeur de sodium, à la longueur d'onde de 589 nm et à 20 °C.

L'indice de réfraction des huiles varie en fonction de leurs insaturations. L'indice de réfraction croît avec le degré d'insaturation des acides gras contenus dans les matières grasses. Il permet de différencier l'appartenance du corps gras aux deux groupes suivants :

- **Graisses lauriques végétales** : (IR= 1,448 à 1,458) ou **animales** (IR=1,471 à 1,458) ;
- **Huiles végétales** : (IR=1,468 à 1,490) ou **animales** (IR=1,471 à 1,485).

Cependant, il autorise le suivi des opérations d'hydrogénation et de fractionnement des corps gras (Adrian et al., 1998).

La surface du prisme du réfractomètre est nettoyée avec du papier Joseph et, après étalonnage avec de l'eau distillée à 20 °C, une goutte d'huiles de nigelle est déposée sur le prisme.

La fenêtre de lecture donne directement la valeur de l'indice de réfraction à la température « t° » en degré Celsius.

Afin de ramener la valeur de cet indice de réfraction mesuré pour un liquide à une température t, à la valeur référencée à T=20°C, on peut utiliser une relation affinée valable pour de faibles écarts de température :

Si la différence entre la température de mesurage t et la température de référence T est inférieure à $3\text{ }^{\circ}\text{C}$, l'indice de réfraction est donnée par la formule :

$$a)- \text{Si } t > T \quad \mathcal{N}_D^T = \mathcal{N}_D^t + (t - T) \times \mathcal{F}$$

$$b)- \text{Si } t < T \quad \mathcal{N}_D^T = \mathcal{N}_D^t + (T - t) \times \mathcal{F}$$

Où :

t : température de la détermination ;

T : Température de référence qui est $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour les huiles ;

\mathcal{F} : Facteur de correction, fonction de la température, égal à $0,00035$ pour $T=20^{\circ}\text{C}$, pour les huiles ;

\mathcal{N}_D^T : L'indice de réfraction pris sur le réfractomètre.

II.3. Indice d'Acide (NF EN ISO 660)

L'hydrolyse des corps gras, qu'elle soit d'origine chimique (présence d'eau) ou enzymatique par les enzymes lipolytiques (palme, karité, olive) entraîne la formation d'acides gras libres.

L'acidité oléique d'une huile représente le pourcentage des acides gras libres (=FFA pour *free fatty acids*) exprimé conventionnellement en acide oléique pour les huiles végétales (Ollé, 2002).

Il s'exprime par le nombre de mg d'hydroxyle de potassium nécessaire pour neutraliser l'acidité grasse présente dans 1g de lipide (Adrian et al., 1998).

Cet indice indique le degré d'altération des esters (essentiellement des triglycérides) présents dans le corps gras.

Après avoir pesé exactement 0.5g d'huile dans un erlenmeyer de 250 ml , on les dissout avec 100 ml d'éthanol 95% / étherdiéthylique ($50-50\text{ v/v}$). On dose avec une solution de KOH éthanolique de normalité 0.5 N après avoir ajouté 2 à 3 gouttes de phénolphaléine jusqu'à coloration rose persistant.

Pour les calculs :

$$\text{Acidité (\%)} = V \times C \times M / 10 \times m$$

$$IA(\%) = 56,1 \times V \times C / m$$

Où :

56,1 : Masse molaire (g/ moles) de l'hydroxyde de potassium ;

V : Volume (ml) d'hydroxyde de potassium utilisé ;

C : Concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée ;

m : masse en grammes de la prise d'essai ;

M : 282 pour l'acide oléique.

II.4. Indice d'Iode (NF ISO 3961)

L'indice d'iode appelé aussi *indice de Hübl*, est la masse en grammes d'iode fixé sur les doubles liaisons présentes dans 100g de corps gras (Salgarolo, 2003).

La méthode de WIJS est certainement la plus utilisée (possibilité de trouver dans le commerce du réactif prêt à l'emploi) (Ollé, 2002).

Le dosage consiste à faire réagir une solution halogénante, 25 ml de réactif de Wijs sur une masse d'échantillon de 0,13 g préalablement dissous dans 20 ml de chloroforme.

L'eren contenant la solution est bouché hermétiquement et placé dans un endroit sombre pendant une heure après l'avoir agité fortement. On ajoute ensuite 20 ml d'iodure de potassium (KI) à 10% et 150 ml d'eau distillée afin d'extraire l'iode en excès dans la phase aqueuse.

On titre le thiosulfate de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,1N en présence d'empois d'amidon et cela jusqu'à décoloration complète des deux phases (la disparition de la couleur bleue violette pour devenir transparente) (Salgarolo, 2003).

La réaction peut être accélérée par l'emploi d'un catalyseur, l'acétate mercurique dans l'acide acétique (Guillemin, 2006).

Un **essai à blanc** est préparé en suivant le même mode opératoire.

L'indice d'iode se détermine de la manière suivante :

$$II = ((V_0 - V) \times C \times 12.96) / m$$

Où :

V_0 : Volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour l'essai à blanc ;

V : Volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour la détermination ;

C : Concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée de thiosulfate de sodium utilisée ;

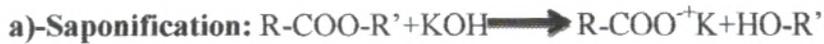
M : masse (g) de la prise d'essai.

II.5. Indice de saponification (NF ISO 3657)

Si la détermination de l'indice de saponification est une opération caractéristique de l'analyse des lipides, elle est destinée essentiellement aux contrôles industriels (savonnerie). Elle consiste à transformer en savons solubles (sodiques ou potassiques) la totalité des acides gras présents à l'état estérifié dans une matière grasse et à régénérer le glycérol dans le cas des triglycérides (Adrian et al., 1998).

L'indice de saponification ou indice de *Koettstoerfer* est la masse en milligrammes de potasse nécessaire pour saponifier 1 g de corps gras. En effet, plus les molécules d'acides renferment des atomes de carbone, moins l'indice de saponification est élevé. Il rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras (Ollé, 2002 ; Salgarolo, 2003).

La réaction de *saponification* est complète, irréversible et rapide. Elle est à différencier de la réaction d'*estérification* qui est incomplète, réversible et lente.



Une masse de 2g d'huile est dissoute dans une solution de KOH (0,5N) dans l'éthanol puis introduite dans un ballon à col rodé. Le ballon est connecté à un réfrigérant à reflux et porté à ébullition durant au moins 60 minutes. On agite de temps en temps.

L'excès de KOH est titré par une solution d'acide chlorhydrique HCL (0,5N), en présence de phénolphtaléine.

Un **essai à blanc** est préparé en suivant le même mode opératoire.

L'indice de saponification (IS) se détermine ainsi :

$$IS = (V_0 - V_1) \times C \times 56.1 / m$$

Où :

V₀ : Volume d'acide chlorhydrique (ml) nécessaire pour titrer le blanc ;

V₁ : Volume d'acide chlorhydrique (ml) nécessaire pour titrer l'essai ;

C : Concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'acide chlorhydrique utilisée ;

m : masse (g) de la prise d'essai.

II.6. Indice de peroxyde (NF T 60-220 et ISO 3960)

L'indice de peroxyde (encore appelé indice de *Léa*) est recherché pour évaluer l'état de conservation d'une matière grasse au cours du stockage. En effet, les corps gras peuvent s'oxyder en présence d'oxygène et de certains facteurs favorisants (UV, eau, enzyme, trace de métaux,...) (Cheftel et al., 1984).

Les premiers composés formés au cours de l'oxydation sont les peroxydes ou les hydroperoxydes. Ceux-ci vont ensuite évoluer vers des composés plus stables : aldéhydes, cétones, acides.

L'indice de peroxyde est le nombre de microgrammes d'oxygène actif contenus dans un gramme de corps gras et susceptibles d'oxyder l'iodure de potassium. Il est exprimé en microgrammes par gramme ou plus souvent en milliéquivalent d'oxygène actif par kilogramme.

Cet indice permet d'apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative de l'huile (Ollé, 2002).

Environ 5g de matière grasse sont dissous dans 10ml de chloroforme, 15ml d'acide acétique et 1ml d'iodure de potassium saturé. L'eren contenant ce mélange est fermé avec un bouchon et laissé pendant exactement 5 minutes à l'abri de la lumière.

L'iode libéré est titré avec une solution de thiosulfate de sodium (0,02N) après avoir ajouté 75ml d'eau distillée, en utilisant l'empois d'amidon comme indicateur coloré.

Un **essai à blanc** est préparé en suivant le même mode opératoire.

L'indice de peroxyde (IP) est donné par :

$$IP = ((V_1 - V_0) \times C / m) \times 100$$

Où :

V_0 : Volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour l'essai à blanc ;

V_1 : Volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour la détermination ;

C : Concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée de thiosulfate de sodium utilisée ;

m : masse (g) de la prise d'essai.

Remarque

Toutes les analyses ont été répétées trois fois.

III. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile de nigelle

Cette étude a été réalisée au laboratoire de « Contrôle de Qualité et Analyses (CQA) » du département de biologie.

Notre travail expérimental a porté sur l'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique d'une huile végétale sur six souches microbiennes dont la nature et l'origine d'huile et des souches utilisées sont indiquées dans le tableau n°06.

III.I. Matériel

III.I.1. Matériels biologique

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

		Nature	Origine
Huile		Nigelle « <i>Nigella sativa</i> »	➤ Notre huile végétale a été fournie par le laboratoire des produits naturels (LAPRONA) Université de Tlemcen ; et a été stockée à +4°C à l'obscurité.
Souches	Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Staphylococcus aureus</i> *ATCC 25923 ; ➤ <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 ; ➤ <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ; ➤ <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ; ➤ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ; 	➤ Les six souches utilisées sont des souches de référence provenant de laboratoire des produits naturels (LAPRONA) Université de Tlemcen.
	Levure	➤ <i>Candida albicans</i> ATCC 33210.	

* ATCC : Américain Type of Culture Collection.

III.I.2. Milieux de culture et solutions de dilutions (Annexes)

- Gélose nutritive ;
- Gélose Chapman ;
- Gélose Mac conkey ;
- Bouillon coeur cerveau (BHIB);
- Gélose à Esculine : Esculine iron agar (EIA) ;
- Gélose Mueller-Hinton ;
- Gélose Sabouraud ;
- Bouillon nutritif ;
- Bouillon Sabouraud ;
- Eau physiologique;
- Eau distillée.

III.II. Méthodes

III.II.1. Isolement et purification

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

Ces cinq 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, à partir de chaque tube incubé, nous avons ensemencé par la technique d'épuisement deux boîtes de pétri préalablement coulées contenant le milieu spécifique pour chaque souche, pour être incubées à 37°C / 24h.

Les différents milieux utilisés pour la culture et l'isolement des différentes souches sont mentionnés dans le tableau n° 07.

Tableau n°7 : Milieux de culture spécifiques pour l'isolement et la croissance des différentes souches de référence.

Souches	Milieux utilisés	
	Solide	liquide
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gélose Chapman	Bouillon nutritif
<i>Bacillus subtilis</i>	Gélose nutritive	Bouillon nutritif
<i>Escherichia coli</i>	Gélose Mac conkey	Bouillon nutritif
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gélose EIA	Bouillon nutritif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose Mueller-Hinton	Bouillon nutritif
<i>Candida albicans</i>	Gélose Sabouraud	Bouillon Sabouraud

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

III.II.2.Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile de nigelle

Deux techniques sont utilisées pour la réalisation de ce test :

III.II.2.1.Méthode de diffusion des disques (contact indirect)

Cette méthode suit le même principe de l'antibiogramme. Elle consiste à déposer un disque imprégné d'huile de nigelle à la surface d'un milieu solide déjà ensemencé par écouvillonnage.

III.II.2.2.Méthode des puits

Après avoir coulé la boîte, on réalise un puits au centre du milieu préalablement ensemencé, et on dépose 20 µl d'huile de nigelle.

Le milieu utilisé dans ces deux méthodes est la gélose Mueller Hinton pour les souches bactériennes et la gélose Sabouraud pour *C. albicans* (Joffin, 2001).

Ce test nous permet d'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles végétales.

La technique comprend trois grandes étapes qui sont :

- Préparation de l'inoculum ;
- Ensemencement ;
- Dépôt de disques.
- **Préparation de l'inoculum**

Une ou deux colonies sont prélevées et ensemencées dans 5ml de bouillon BHIB et incubées à 37°C/24h. Le repiquage de *C. albicans* a été réalisé sur bouillon Sabouraud. A 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 McFarland et équivalent à 10⁸UFC/ml (Aboun *et al.*, 2001 ; Abi-ayed, 2009).

Concernant l'inoculum de *C. albicans* la densité finale est équivalente à 0,5 McFarland. (Haceket *al.*, 1995)

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.

➤ **Ensemencement**

Après avoir coulé 20 ml de gélose Mueller Hinton, l'ensemencement a été fait par technique d'écouvillonnage en faisant tourner la boîte de pétri à 60° deux fois successivement. Cette opération a été répétée pour les six boîtes.

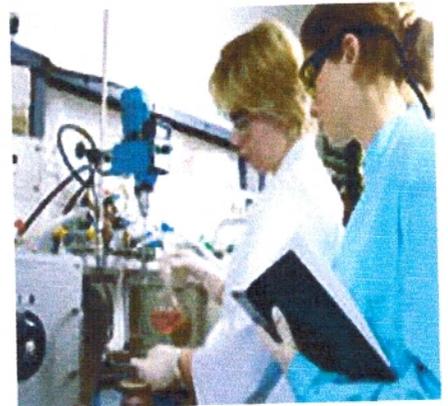
Concernant *C. albicans* le test a été réalisé sur le milieu Sabouraud.

➤ **Dépôt de disques**

Deux disques en papier Whatman de 5,5 mm de diamètre sont appliqués au centre du milieu déjà ensemencé. A l'aide d'une micropipette déposer l'huile de nigelle sur les disques.



Troisième partie: Résultats et discussion



I.Extraction de l'huile

L'huile de *Nigella sativa* a été extraite des graines par la méthode soxhlet en utilisant l'hexane comme solvant. Selon Boublenza I., 2009, il est préférable d'effectuer l'extraction avec l'éther de pétrole (bp : 35-60°C) car il est plus volatil que l'hexane (bp : 69°C) et le chloroforme (bp : 60,5-61,5°C) ; aussi il minimise ainsi les traces de solvant dans l'huile de nigelle. (bp : « boiling point »)

Au cours de l'extraction, deux paramètres ont été mis en jeu :

I.1.Mode de séchage des graines

Après le lavage des graines, le séchage a été fait à l'air libre pendant 48 à 72 heures, car c'est la méthode qui donne un maximum de rendement en huile (**Boublenza I., 2009**). Il est souhaitable de sécher les graines à la plus basse température possible (température ambiante) ce qui permettrait d'éviter toute dégradation qualitative de l'huile (**Boublenza I., 2009**).

Des travaux de la littérature, effectués sur différents types de graines, suggèrent de les sécher à des températures de 80-100°C avant toute extraction, dans le but d'éliminer le maximum d'eau et augmenter donc les rendements par rapport à la matière sèche (**Haidara, 1996**).

I.2. Temps d'extraction

Le temps d'extraction joue un rôle important dans le rendement en huile car il augmente avec le temps, mais après avoir extrait toute l'huile pendant 8h (temps préconisé par la méthode officielle), il n'y a plus d'accroissement sensible du rendement ; ce qui nous amène à la conclusion qu'une extraction de 6 h est largement convenable d'un point de vue rapport temps / rendement. De plus, en minimisant le temps d'extraction, on évite toute altération possible d'huile (**Boublenza I., 2009**).

I.3.Rendement en huile

Les huiles extraites à partir des graines de nigelle sont de couleur jaune, d'une odeur et d'une saveur faiblement prononcées.



Photo n°1 : Huile de nigelle

Nos résultats révèlent un rendement moyen en huile fixe de l'ordre 31,75% qui dépasse celle trouvée dans d'autres travaux 24% (**Achour Tani K. 2013**). D'autre part, ce rendement est inférieur à celui trouvé dans la littérature 37,9-39,2% (**Ramadan et Mörsel, 2002**).

Ces variations pourraient être expliquées par la provenance géographique des échantillons notamment le facteur climatique, la date de récolte des graines, la durée et les conditions de conservation, etc.

I.4.Mode de conservation de l'huile de nigelle

Après avoir séchée l'huile pendant une demi-heure dans l'étuve, celle-ci est stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité dans des flacons en verre fumé au réfrigérateur.

Une analyse physico-chimique et une étude de l'activité antimicrobienne est réalisée sur l'huile de nigelle et est décrite après.

II. Analyses physico-chimiques de l'huile de nigelle

Pour effectuer une analyse complète d'une huile végétale, il est nécessaire d'utiliser la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et éventuellement la CPG à la spectrométrie de masse.

Cependant, avant que ces techniques aient été développées, on utilisait et on utilise encore des paramètres plus faciles d'accès pour caractériser les différentes caractéristiques physico-chimiques des huiles.

Le but de notre travail est de comparer les paramètres physico-chimiques de l'huile de nigelle avec celles des huiles de coloquinte et d'olive utilisées comme échantillon de référence.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant:

Tableau n° 08 : Résultats des analyses physico-chimiques de l'huile de nigelle.

Auteurs et Normes Indices	Echantillon analysé	Littérature (Achour Tani ,2013)	Normes
Densité relative	0,911	0,913	0,921 +. 0,0002
Réfraction	1,467	1,684	1,472+. 0,0002
Acide (%)	1,470	3,3	1,468-1,472
Iode (g/ 100g d'huile)	119,63		128+21
Saponification	205,57	291,77	203+.3
Peroxyde (meq O₂/Kg)	7		10,7+.0,4

- Les graisses lauriques végétales : dont l'indice de réfraction est compris entre $IR=1,468$ et $IR=1,458$.
- Les huiles végétales : dont l'indice de réfraction est compris entre $IR=1,468$ et $IR=1,490$.

Dans notre cas, l'indice de réfraction mesuré de l'huile de nigelle est $IR=1,467$ selon les résultats obtenus et présentés dans le tableau n°8. Cette valeur est inférieure à la norme et à la valeur citée dans le travail d'Achour Tani (2013). On peut donc conclure que le degré d'insaturations des acides gras contenus dans la matière grasse de notre l'huile est faible.

Cette valeur de l'indice de réfraction reste toujours inférieure à celles de l'huile de coloquinte (voir tableau annexe 2) et de l'huile d'olive(voir tableau annexe 3).

II.3. Indice d'acide

L'indice d'acide est la masse de potasse (en %) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres d'un corps gras. Il indique le degré d'altération des esters (essentiellement des triglycérides) présents dans le corps gras (**Boublenza I., 2009**).

Au vu du tableau n°8, on remarque que notre l'huile a un indice d'acide de l'ordre de 1,470% ; valeur en accord avec la norme ; mais elle est inférieure à celle citée par Achour Tani (2013).

Puisque notre valeur de l'IA conforme à la norme, donc on peut dire que notre échantillon est de bonne qualité.

II.4. Indice d'iode

L'indice d'iode mesure globalement le degré d'insaturation d'un corps gras en déterminant le nombre de gramme d'iode fixé par 100g de corps gras. En présence d'un large excès d'halogénure d'iode, l'iode est fixé sur les doubles liaisons en une heure. L'iode non consommé est ensuite dosé en retour par le thiosulfate.

Plusieurs méthodes sont proposées :

- Méthode de Wijs en présence de trichlorure d'iode ;
- Méthode de Hanüs en présence de monobromure d'iode ;
- Méthode au brome.

II.7. Récapitulatif des résultats

Les différentes valeurs des caractéristiques physico-chimiques se divisent en deux groupes :

- Celles qui rendent compte de la qualité de l'huile (densité, indice de réfraction, indice de saponification, indice d'iode)
- Celles qui rendent compte de l'altération de l'huile (indice d'acide et indice de peroxyde).
- Le récapitulatif de tous les résultats de l'analyse physico-chimique de l'huile est représenté dans le tableau n°9.

Dans notre cas, nous avons comparé les valeurs des caractéristiques physico-chimiques qui rendent compte de l'altération aux normes imposées par le *Codex Alimentarius*, aux résultats cités par d'autres travaux et aussi aux caractéristiques physico-chimiques des deux huiles (coloquinte et d'olive).

Au vue de ces résultats, notre l'huile de nigelle pourrait être classée parmi les huiles comestibles. Ou sera affirmatif après un travail complémentaire relatif à une étude toxicologique.

II.8. Comparaison de la composition chimique de l'huile de nigelle avec les autres huiles analysées (coloquinte et olive)

La détermination de la composition chimique des huiles végétales nécessite des méthodes plus spécifiques telles que la :

- Chromatographie en phase gazeuse(CPG) ;
- Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ;
- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).Dans notre travail, on va se baser sur les données de la littérature en raison de l'absence des moyens pour réaliser ce type d'analyse.

Les compositions chimiques des trois huiles analysées sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau n°10 : Compositions chimiques des trois huiles analysées

Nature de l'huile	Composition chimique
<p>Nigelle</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 96,1-97,2% de lipide neutres (Ramadan et Mörsel, 2002) ; ➤ 3% de lipides polaires (Ramadan et Mörsel, 2002) ; ➤ 0,32-1,05% de phospholipides (Ramadan et Mörsel, 2002) ; ➤ Glycolipides : 55,6% de digalactosyl diacyl glycérol (Ramadan et Mörsel, 2003) ; ➤ Acide gras insaturé : Acide linoléique suivi par l'acide oléique (Nickavar et al., 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007) ; ➤ Acide gras saturé : Acide palmique (Nickavar et al., 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007). ➤ Autres : Acide myristoleique, palmitoleique, margarique, arachidique, eicosenoique, behénique, lignocérique (Nickavar et al., 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007) ; ➤ 17,41-42,66% de stérols (Cheikh-Rouhou et al., 2007) ; ➤ Un faible taux en cholestérol (Ramadan et Mörsel, 2002).
<p>Coloquinte</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 76,4% d'acide linoléique (Huang et al ., 1994 ; Udayasekhara, 1994) ; ➤ 0,5% d'acide linoléique (Sebbagh et al ., 2009) ; ➤ 8,1% d'acide palmitique (Sebbagh et al ., 2009) ; ➤ 7,8% d'acide oléique (Sebbagh et al ., 2009). ➤ 6,1% d'acide stéarique (Sebbagh et al ., 2009) ; ➤ 1-2,15 % d'hydrocarbures, d'aldéhydes, de cétones, de pigments et de vitamines liposolubles (Badifu, 1991 ; Sawaya et al ., 2006) ; ➤ Phytostérols : 60-65% de β-sitostérol (Badifu, 1991) ; ➤ Trace de α-tocophérol et de β- carotène (Badifu, 1991).

Olive	<ul style="list-style-type: none">➤ 95% triacylglycérols (Kiritsakis, 1997) ;➤ 72% d'acide gras mono-insaturés (Harwood, 2000) ;➤ 14%d'acide gras poly-insaturés (Harwood, 2000) ;➤ 14%d'acide gras saturés (Harwood, 2000) ;➤ 70% d'acide oléique (Harwood, 2000) ;➤ Composés phénoliques simples et complexes (Fedeli, 1977) ;➤ Tocophérols : Vitamine E (Burton, 1986) ;➤ Composés aromatiques (Angerosa, 2002) ;➤ Hydrocarbures : 400-450mg/100g de squalène (Owen et al., 2000) ;➤ 0,03-0,36mg/100g β-carotène (provitamine A) (Kiritsakis et Markakis, 1987) ;➤ Pigments (Mínguez-Mosquera et al., 1991 ; Gandul-Rojas et Mínguez-Mosquera, 1996).
--------------	---

D'après les résultats mentionnés dans le tableau n°10, on remarque une variation dans la composition chimique d'une huile à une autre. Si on prend en considération l'huile de nigelle, on estime qu'elle est riche surtout en lipide neutres suivie par les lipides polaires, les phospholipides et les glycolipides aussi. Pour les acides gras insaturés (acide linoléique suivi de l'acide oléique), les acides gras saturés et même les stérols avec une faible teneur en cholestérol comme elle est riche aussi en thymokinone (protecteur et antimicrobien).

Par contre, l'huile de coloquinte contient une bonne quantité d'acide linoléique (C18 :2) qui est un acide gras essentiel et une petite teneur en acide linoléique (C18 :3). Elle renferme aussi l'insaponifiable qui est la partie non glycéridiques de l'huile (un mélange d'hydrocarbures, d'aldéhydes, de cétones, de pigments et de vitamines liposolubles).

Concernant la troisième huile analysée (huile d'olive), elle contient des composés phénoliques simples et complexes lui augmenta sa stabilité, lui conférant des propriétés antioxydantes et lui modulent sa saveur (**Fedeli, 1977**). Ces composés contribuent fortement au gout piquant, à l'astringence et à l'amertume des huiles (**Brenes, 2000**). Les tocophérols

III. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile de nigelle

La maîtrise des infections bactériennes et fongiques devient complexe du fait de l'émergence de bactéries et de champignons résistants à de nombreux antibiotiques conventionnels.

Face aux problèmes de santé publique, les plantes médicinales pourraient apporter une réponse thérapeutique adaptée à ces phénomènes. Les remèdes à base de plantes constituent une nouvelle alternative pour combattre ces épidémies qui, à notre ère ne devaient plus exister.

III.1. Isolement et purification

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

Les résultats obtenus sont montrés dans les photos suivantes :

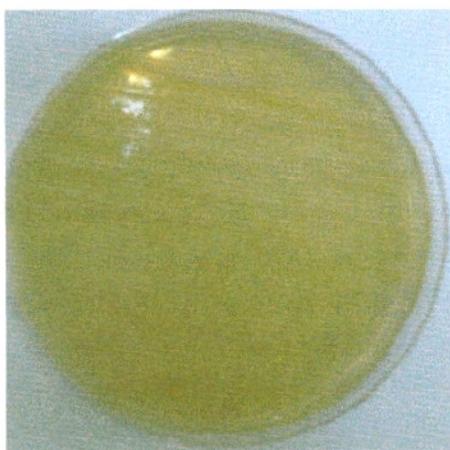


Photo n° 02 : Aspect de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose Mueller –Hinton.



Photo n° 03 : Aspect de *Bacillus subtilis* sur gélose nutritive.



Photo n° 04 : Aspect d'*E. coli* sur gélose Mac conkey.

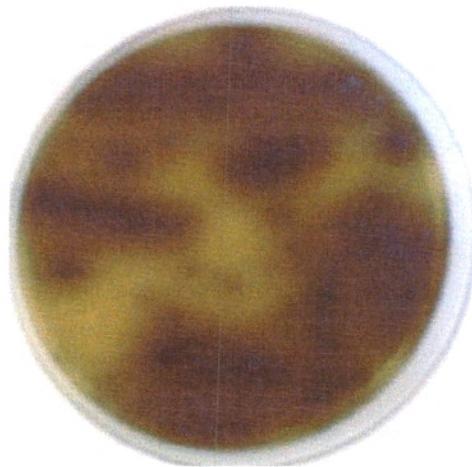


Photo n°05 : Aspect d'*Enterococcus faecalis* sur gélose EIA.

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

Espèce	Milieu utilisé	Aspect des colonies
<i>S. aureus</i>	Gélose Chapman	Des colonies crémeuses, opaques et pigmentées (typiquement jaune d'or).
<i>Bacillus subtilis</i>	Gélose nutritive	des colonies de formes irrégulières de consistance crémeuse.
<i>E. coli</i>	Gélose Mac conkey	Colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gélose EIA	Petites colonies translucides entourées par un halo noir
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose Mueller-Hinton	Des colonies verdâtres et légèrement bombée à contour régulier.
<i>C. albicans</i>	Gélose Sabouraud	Grandes colonies, rondes, de couleur blanche ou crème.

III.2. Evaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile de nigelle

III.2.1.Méthode de diffusion des disques (contact indirect)

Ce travail a pour but de démontrer si l'huile de nigelle a un pouvoir antimicrobien sur les souches bactériennes pathogènes.

Cette méthode consiste à mesurer la sensibilité des bactéries dans l'huile pure sans émulsifiant. Dans ce cas on a utilisé la méthode de diffusion sur gélose qui consiste à imprégner des disques d'huile de nigelle sur la gélose Mueller-Hintonensemencée. Après incubation, on remarque les zones d'inhibitions qui sont sous forme d'un halo clair autour des disques.

Les résultats de cette méthode sont représentés dans les photos suivantes :

ZD : Zone d'inhibition.

MD : Méthode de disque.

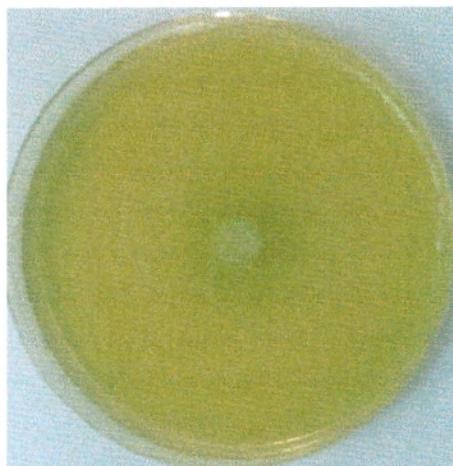


Photo n°08 : ZD de l'huile de nigelle sur *E. coli* (MD).

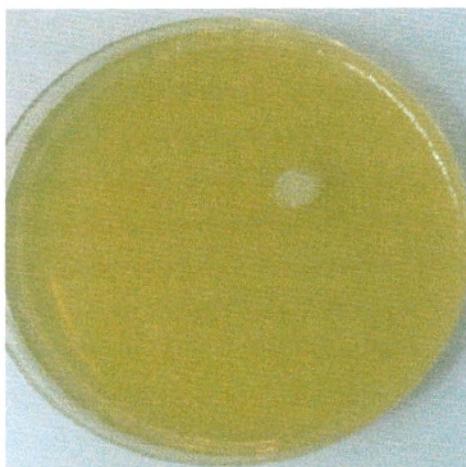


Photo n°09 : ZD de l'huile de nigelle sur *B. subtilis* (MD).



Photo n°10 : ZD de l'huile de nigelle sur *S. aureus* (MD).

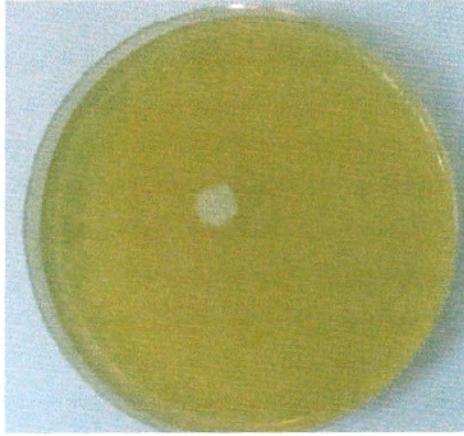


Photo n°11 : ZD de l'huile de nigelle sur *P. aeruginosa* (MD).

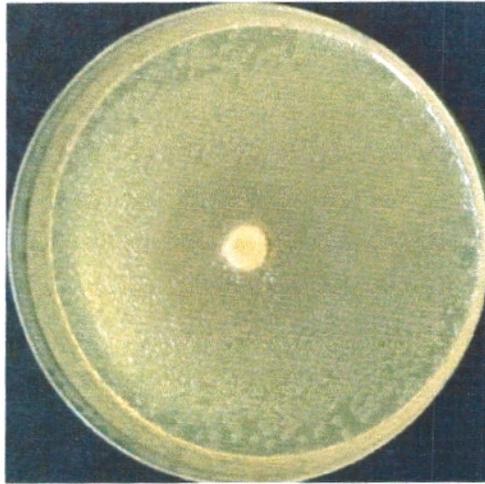


Photo n° 12 : Aspect d'*E. faecalis* en présence de l'huile de nigelle (MD).

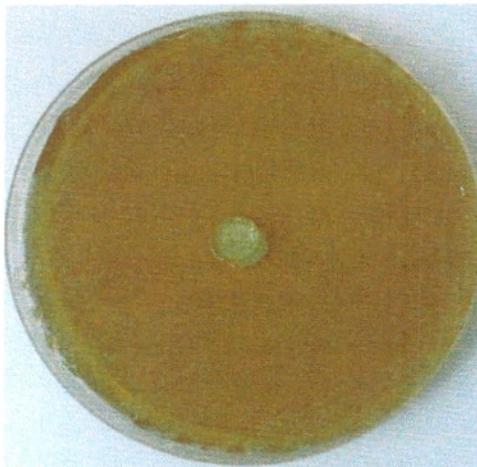


Photo n° 13 : Aspect de *C. albican* en présence de l'huile de nigelle (MD).

Au vu de ces résultats, on remarque une large sensibilité des souches de *S. aureus* et *B. subtilis* vis-à-vis de l'huile de nigelle et une faible sensibilité pour *P. aeruginosa* et *E. coli*.

Bien que la souche *E. faecalis* ait présenté une très faible sensibilité à l'huile de nigelle, cette dernière semble n'avoir aucune activité dans ce test.

Concernant l'activité antifongique, notre huile semble être inactive sur *C. albicans*.

Donc la méthode des disques ne fournit que des informations qualitatives sur la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis-à-vis du produit à tester (Hart, 1999 ; Rey, 2010).

Pour confirmer ces résultats on passe à la méthode des puits (contact direct).

III.2.2.Méthode des puits

Au vu des résultats précédents, ce test est réalisé dans le but de les confirmer.

Les résultats obtenus sont représentés dans les photos suivantes :

MP : Méthode des puits.

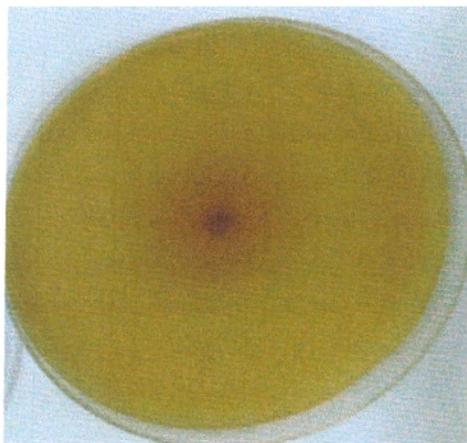


Photo n°14 : ZD de l'huile de nigelle sur *E. coli* (MP).

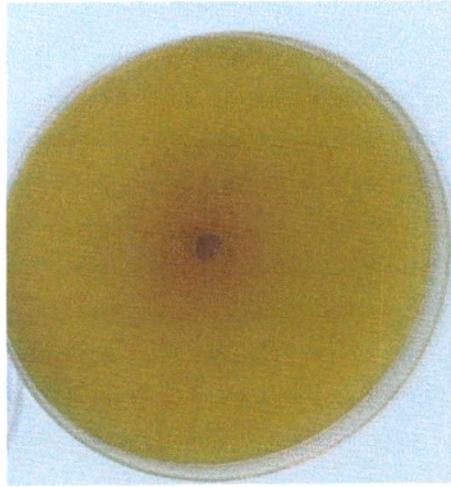


Photo n°15 : ZD de l'huile de nigelle sur *B. subtilis* (MP).

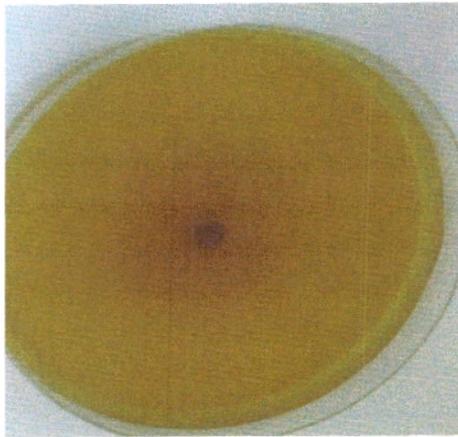


Photo n°16 : ZD de l'huile de nigelle sur *S. aureus* (MP).



Photo n°17 : ZD de l'huile de nigelle sur *P. aeruginosa* (MP).

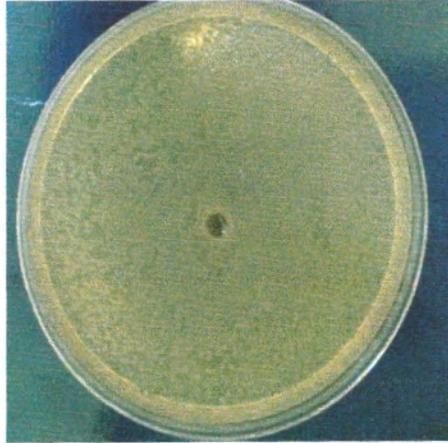


Photo n° 18: Aspect d'*E. faecalis* en présence de l'huile de nigelle (MP).

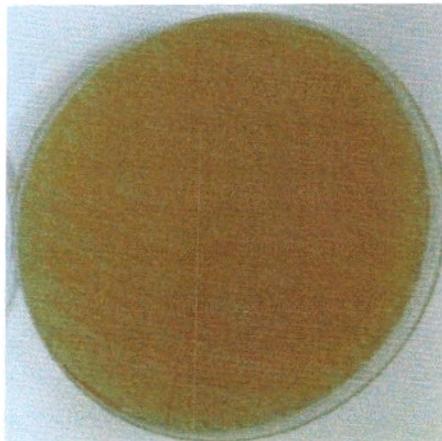


Photo n° 19 : Aspect de *C. albican* en présence de l'huile de nigelle (MP).

A partir de ces résultats, on peut confirmer la sensibilité des quatre souches bactériennes vis-à-vis de l'huile de nigelle et la résistance contre les *E. faecalis* et *C. albicans*.

➤ Discussion

Cette étude démontre que l'huile de nigelle a une activité variable sur les souches à Gram positif qui sont *S. aureus* et *B. subtilis* sauf *E. faecalis*, ainsi qu'une activité sur les souches à Gram négatif qui sont *E. coli* et *P. aeruginosa* par la méthode de diffusion des disques. Ce résultat correspond bien à celui des travaux de **Harzallah et al., (2012)** qui ont trouvé avec la même méthode que la souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 était la plus sensible parmi l'ensemble des souche testées dont le diamètre de la zone d'inhibition est de l'ordre de 16,66 mm.

Par la même méthode **Kökdil et al., (2005)** ont confirmé l'activité antibactérienne de l'huile de nigelle sur l'espèce *S. aureus* et *B. subtilis* en utilisant respectivement un diamètre de sensibilité de 12,15 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)**. Ces derniers ont trouvé aussi une activité assez importante de cette huile sur *B. subtilis* similaire à celle sur les *S. aureus* qui s'est soldé par un diamètre de 24 mm.

Nos résultats montrent que parmi les bactéries à Gram positif l'espèce *E. faecalis* est la moins sensible vis-à-vis de cette huile, ce qui concorde avec les résultats de **Harzallah et al., (2012)** qui ont trouvé un diamètre d'inhibition ne dépassant pas les 9.33 mm. Contrairement à ce résultat, 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*, *P. aeruginosa*), l'huile de *N. sativa* a exercé une activité antimicrobienne, résultat prouvé par les travaux de **Harzallah (2012)** qui a déclaré que cette l'huile a un 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 le rat, 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 compositions chimiques et leur morphologies (**Enwuru et al., 2008**).

Toutefois **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 longue chaîne sont des substances bactéricides des microorganismes pathogènes incluant le *S. aureus* résistant à la Methicillin(SARM) et responsables de la surinfection post opératoire (**Nadkarni, 1976**) (*H. pylori* responsable des ulcères gastroduodénaux), (les Mycobactéries responsables de la lèpre et de la tuberculose)(**Nickavara et al., 2003**).

Bien que l'acide linoléique et l'acide oléique soient des composés majoritaires de l'huile fixe de *N. sativa*, la probabilité que d'autres composés peuvent agir en mode d'addition ou de synergie en augmentant la propriété antimicrobienne de cette huile ne peut pas être exclue actuellement (**Harzallah et al., 2012**).

Nos résultats ont montré l'absence de l'activité antibactérienne envers la bactérie à Gram Positif et la levure *C. albicans*. 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 positifs est composée uniquement du peptidoglycane ce qui la prédispose à une importante sensibilité aux agents antimicrobiens (**Enwuru et al., 2008 ; Salman et al., 2008**).

D'autres chercheurs ont rapporté que des extraits bruts des gaines de *N. sativa* ont un effet inhibiteur sur des microorganismes réputés pour leur multi- résistantes, y compris l'espèce *Vibrio choléra*, *S. aureus*, *Shigella*, et *C. albicans* **Salman et al., 2008**).

Les recherches de **TANIS et al.,(2009)** ont montré que d'autres plantes du genre *Nigella* ont des propriétés antimicrobiennes et ceci est valable pour les extraits des différentes parties des plantes (tige, feuilles, capsules et fleurs) et ont montré également que parmi l'ensemble des plantes testées, les extraits qui possédaient le pouvoir antimicrobien le plus prometteur étaient ceux des graines de *N. sativa* .

Plusieurs études consacrées à l'huile essentielle de *N. sativa* et ses constituants ont révélé qu'elle est également dotée de grandes propriétés antimicrobiennes qui pourraient être dues à la présence de thymoquinone, thymohydroquinone et de thymol (Aljabre *et al.*, 2005 ; Randhawa *et al.*, 2005 ; El Thireet *et al.*, 2007).

A titre de comparaison de l'effet antimicrobien de notre l'huile avec ceux de l'huile de coloquinte de l'autre travail qui est fait en parallèle, les résultats montrent que les quatresouches bactériennes *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* et *P. aeruginosa* ont présenté des sensibilités à l'huile de coloquinte sauf le cas d'*E. faecalis* et *C. albicans*.

Une résistance a été signalée par les travaux de Boublenza, (2011) sur les espèces *S.aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* et *P. aeruginosa*.

Certains chercheurs ont travaillé sur les extraits de toutes les parties de la plante *Citrulluscolonythis* tels les racines, la tige, les feuilles, les fruits et les graines et ont montré que toutes les parties possédaient une activité antibactérienne contre les Gram positif (*E. faecalis* et *S. aureus*) et les Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) à un degré moindre pour les racines.

Cette activité de l'huile de coloquinte a été corrélée à la présence de certains composés dont les hydrates de carbone, les flavonoïdes, les glycosides et les tannins qui sont présents dans l'extrait de la plante *Citrullus colocynthis*. Ce derniers utilisé par Memon (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.

Par contre, si on prend en considération l'huile d'olive des travaux cités dans la littérature, les souches bactériennes *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* et la levure *C. albicans* semblent être résistantes aussi à l'huile d'olive.

La résistance de *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* à cette huile a été enregistrée également dans les recherches de Boublenza (2011).

L'étude d'Al-Waili, (2005) a montré que l'huile d'olive a présenté une faible activité sur *S. aureus* et sur *C. albicans*.

En revanche, d'autres chercheurs ont prouvé que l'extrait des feuilles d'olive a une appréciable activité contre *C. jejuni*, *Staphylococcus doré* et les SAMR. Grâce à cette activité spécifique, l'extrait des feuilles d'olivier peut avoir un rôle de régler la composition de la flore gastrique en réduire sélectivement les niveaux des *H. pylores* et de *C.jejuni* (Sudjana *et al.*, 2009).

Par ailleurs **Lee et al.,(2010)** ont montré que des composés phénoliques provenant des extraits des feuilles d'olivier comme l'oleuropéine et l'acide caféique, possédaient des effets d'inhibition contre des micro-organismes. En outre, ils ont prouvé que l'effet antimicrobien des composés phénoliques combinés était sensiblement plus important que ceux des différents composés phénoliques individuellement testés.

Conclusion générale

Utilisées depuis l'antiquité, les plantes n'ont cessé de jouer un rôle de plus en plus important en médecine. Grâce au développement de la chimie, la plupart des principes actifs de ces plantes ont pu être extraits à l'état pur. Souvent ces principes ont justifié à posteriori le bien-fondé de certains remèdes anciens ou populaires (Sirois, 2008).

Le présent travail portant sur l'huile de *Nigella sativa* (nigelle), nous a permis de tirer quelques renseignements :

- L'huile extraite par la méthode du Soxhlet a fourni un rendement relativement bon et une bonne qualité de l'huile ;
- La détermination des caractères physico-chimiques est importante pour la caractérisation de cette l'huile et le contrôle de sa qualité. Les résultats obtenus sont comparables avec ceux d'études réalisées sur la même espèce et avec les normes du *Codex Alimentarius*;
- La détermination des caractéristiques chimiques de l'huile de nigelle ainsi que sa composition par rapport à d'autres huiles végétales analysées nous a révélé que :
 - ✓ Notre l'huile est sensible et facilement dégradable ;
 - ✓ L'obscurité et le froid ne sont pas des conditions suffisantes pour une bonne conservation de l'huile ;
 - ✓ Donc il est impératif de trouver d'autres paramètres pour une bonne conservation comme par exemple l'utilisation d'un agent conservateur.

A la lumière des résultats obtenus par l'étude du pouvoir antimicrobien de l'huile de *Nigella sativa*, on constate qu'elle est plus active sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram⁺) et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Gram⁺) ; et moins active sur *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram⁻) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram⁻) ; avec une absence totale de sa activité antimicrobienne sur *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Gram⁺) et la levure *Candida albicans* ATCC 33210.

Nous nous sommes fixés comme perspectives pour ce travail :

- D'analyser l'huile de nigelle par CPG et SM, puis d'affiner l'analyse sur l'insaponifiable car elle pourrait renfermer de nombreuses molécules « intéressantes » ;

- De tester l'huile de nigelle sur d'autres souches de bactéries et de champignons, mais aussi tenter de l'émulsifier avec d'autres produits ;

- D'effectuer une étude toxicologique de l'huile de nigelle pour pouvoir la valoriser comme huile végétale comestible ou thérapeutique ;

- De mener des études microbiologiques sur d'autres huiles fixes telles que l'huile de coloquinte. Cette dernière semble donner de meilleurs résultats quant à son pouvoir antimicrobien.

Références bibliographiques

A

- ❖ **Abi-ayad M.,2009.** Contribution à l'étude physico-chimique de l'huile essentielle du pin d'Alep (*Pinushalepensis*) de la région de Tlemcen & de son activité antimicrobienne.
- ❖ **Aboun A., Aoun L., Bendimerad K., Boukerrou A., Kechich S.2001.** Antibiogramme en médecine vétérinaire. Standaration de l'aromatogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. Algérie édition.
- ❖ **Achour Tani K.,2013.** Etude phytochimique et activité antioxydante de deux espèces de Nigelle. Mémoire d'étude supérieure en biologie; Université Abou- Bakr Belkaid, Tlemcen. P38.
- ❖ **Adrian J., Potus J., Poiffait A., Dauvillier P., 1998.** Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires. *Techniques et documentation- Lavoisier.* P47-53.
- ❖ **AFNOR :** Recueil des Normes Françaises ; la méthode de Soxhlet : ISO 659 ,1998.
- ❖ **Ait Mbarek L., Ait Mouse H., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Al-Ghamdi M.S., 2001.** The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*, *J. Ethnopharmacol.* **76:** P 45–48.
- ❖ **Al-Hader A, Aqel M, Hassan Z., 1993.** Hypoglycaemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa*. *Int J Pharmacognosy.* **31:** P 96-100.
- ❖ **Ali B.H., Blunden G., 2003.** Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*,*Phytother. Res.* **17:** P 299–305.

- ❖ **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.
- ❖ **Benharref A., Chait A., Kamal M., A. Dalal and Zyad A., 2007.** Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts, *Braz J Med Biol Res Online Ahead of Print* ISSN 0100.
- ❖ **Bonnier, G. ,1990.** La grande flore en couleur. Ed Belin, Paris. Tome 1. P 17.
- ❖ **Boublenza I., 2009.** Contribution à l'étude de l'analyse de l'huile de *Citrullus colocynthis* (Coloquinte) et de son pouvoir antimicrobien. Mémoire de magister de biologie ; Université Abou- Bakr Belkaïd, Tlemcen. P2-3.
- ❖ **Boudjema NE. Ben Guegua H., 2010.** L'effet antibactérien de *Nigella Sativa* Diplôme d'Etudes Supérieures en Biologie. Université Kasdi Merbah Ouargla. P10
- ❖ **Boulatika Y.et HabiS., 2012.** Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile d'olivier (*Olea europaea*), l'huile nigelle (*Nigella sativa*), l'huile de coloquinte (*Citrullus Colocynthis*), l'huile de tournesol (*Helientusannuss*). Mémoire d'ingénieur de biologie ; Université Abou- Bakr Belkaïd, Tlemcen. P1.
- ❖ **Brenes M., Hidalgo F. J., Garcia A., Rios J. J., Garcia P., Zamora R. & Garrido A. 2000.** Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of American oil Chemist's Society*. 77 (7): P715-720.
- ❖ **Bruneton J. ,1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tec&Doc – Lavoisier, Paris.

- ❖ **Burtej.N., 1992.** Le bon jardinier, encyclopédie horticole Volume 3, La maison rustique, Paris. P 12.
- ❖ **Burton G. W. &Ingold K. U. 1986.** Vitamin E: Application of the principles of physical organic Chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research.* **19:** P 194-201.

C

- ❖ **Cheers G., 1997.** Botanica, encyclopédie de botanique et d'horticulture Könemann, Königswinter, Allemagne. P 12.
- ❖ **Cheftel J.C., Cheftel H., 1984.** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. *Techniques et documentation –Lavoisier : Vol1 :* P 244-249.
- ❖ **Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker C., Deroanne C., Attia, H., 2007.** *Nigella sativa* L. chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry.* **101:** 673-681.

D

- ❖ **D'Antuonol. F.; Moretti .A.; Lovato A.F.S., 2002.** Seeds yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. *Industrial Crops and Products***15:** P 59-69.

E

- ❖ **El Tahir K.E.H., and Bakheet D.M., 2007.** The Black seed *Nigella sativa* Linnaeus - a mine for multi-cures: A plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *J. T. U. Med. Sci.*, **1**: P1-19.
- ❖ **El Tahir KE, Ashour MM, al-Harbi MM., 1993.** The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. *Gen Pharmacol*; **24**: P1123-1131.
- ❖ **El-Alfy T, El-Fatary H, Toama M., 1975.** Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil *Nigella sativa* L. *Pharmacologia*. **30**: P109-111.
- ❖ **El-Tahir Ph.D.K.H., Bakeet D.M., 2006.** The Black Seed *Nigella sativa* Linnaeus - A Mine for Multi Cures: A Plea for Urgent Clinical Evaluation of its Volatile Oil. *J T U Med Sc*; **1 (1)**: 1-19.
- ❖ **Enwuru, N.V., S.O. Ogonnia, 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

- ❖ **Fabienne O., 2005.** La Nigelle, une épice d'intérêt médical. Thèse du doctorat en pharmacie. Université Joseph Fourier. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen publications, Inc. 620 pages.

- ❖ **Fedeli E.1977.** Lipids of olives. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids.* 15: P57-74.

G

- ❖ **Gandul-Rojas, B. et Mínguez-Mosquera, M.I.1996.** Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72: 31-39.
- ❖ **Ghazanfar S., Al-Sabahi A., 1993.** Medicinal plants of northern and central Oman (Arabia). *Economic Botany* 47: 1.
- ❖ **Ghedira, K. ,2006.** La nigelle cultivée : *Nigella sativa L.* (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 4: P1-7.
- ❖ **Guignard, J.L. ,2001.** In : *Botanique systématique moléculaire. 12ème Edition Masson (Paris)*, P: P304.
- ❖ **Guillemin S., 2006.** Extraction aqueuse d'huile de Colza assistée par hydrolyse enzymatique : Optimisation de la réaction, caractérisation de l'émulsion et étude de procédés de déstabilisation. Thèse de doctorat, Lorraine, France : P 75-77.

H

- ❖ **Hacek D M., Noskhin G A., Trakas K and Peterson La 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*,33(7):P1884.

- ❖ **Haidara A.O., 1996.** Valorisation d'une huile de végétale tropicale : L'huile de végétale tropicale : L'huile de Pourghère. Mémoire, Sherbrooke, Canada. P 47-61.

- ❖ **Harbone J.P., 1998.** Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall, Londres.

- ❖ **Hart T. and Shears P., 1999.** Atlas de poche de Microbiologie. *Medecine –sciences Flammarion.* P212-218.

- ❖ **Harwood J. L. & Aparicio R. (Eds.) 2000.** Handbook of olive oil: analysis and properties.

- ❖ **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): P 4675-4679.

- ❖ **Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Houtt JR., 1995.** Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med*; **61**: P33-36.

- ❖ **Huang, K., c. c. Ako, et M. C. Erickson. 1994.** Enzymatic modification of melon seed oil: Incorporation of eicosapentaenoic acid. *J. Agr. Food chem.*; **42**:2646-2648.

J

- ❖ **Joffin J., Leyal G., 2001.** Microbiologie technique : 1- Dictionnaire des techniques. 3e éd. - Bordeaux: CRDP d'Aquitaine. - (Biologie technique). p 320

K

- ❖ **Kanter M., Coskun O., Uysal H.,2006.** The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Archives of Toxicology*. Vol. 80. N° 4. P 217-224.
- ❖ **Khan MAU, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH.,2003.** The *in vivo* Antifungal Activity of the Aqueous Extract from *Nigella sativa* Seeds. *Phytother. Res.*, 17: 183–186.
- ❖ **Kiritsakis, A. et Markakis, P.1987.** Olive oil: a review. *Adv. Food Res*, 31: 453-482.
- ❖ **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) : P 183 - 190.

L

- ❖ **Lee Hwan -O., Lee Boo-Y.,2010.** Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101: 3751–3754.

M

- ❖ **Mahfouz M, Abdel-maguid R, El-Dakhakhny M., 1965.**The effect of nigellon therapy on the histaminopexic power of blood sera asthmatic patients. *Arzneimittelforschung*, **15**: P1230-1231.
- ❖ **Mahfouz M, El-Dakhakhny M., 1960.** The isolation of a crystalline active principle from *Nigella sativa* seeds. *Pharm Sci United Arab Rep*; **1**: P19.
- ❖ **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)**: P 1440-1447.
- ❖ **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. Ethnopharmacologie.*, **49**: P101-110.
- ❖ **Medinica R, Mukerjee S, Huschart T, Corbitt W., 1994.** Immunomodulatory and anticancer activity of *Nigella sativa* plant extract in humans. *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting*. P2865.
- ❖ **Memon U., Brohi A. H., Wasecuddin S. A. Azhar I, Bano H.,2003.** Antibacterial screening of *Citrullus colocynthis*. *Pakistan of the pharmaceutical sciences*; **16**: P 1-6.
- ❖ **Meziti A., 2009.** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Étude *inin vitro* et *in vivo*. Mém. Magister. Département des Sciences Biologiques. Faculté des Sciences. Université El-haj Lakhdar. Batna. P 21-23.

- ❖ **Mínguez-Mosquera, M.I. Rejano-Navarro, L. Gandul-Rojas, B. Sánchez-Gómez, A.H. ET Garrido-Fernández, J. 1991.** Color-pigment correlation in virgin oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **68**: P332-336.

N

- ❖ **Nadkarni K., 1976.** *Crocus sativus, Nigella sativa*. In K.M. Nadkarni (Ed.). *Indian Materia Medica.*, P 386–411.
- ❖ **Negre, R., 1962.** Petite flore des régions arides du Maroc occidental, *édition CRNS* Paris. T1:P237-238.
- ❖ **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.* P56 ET 79-84.
- ❖ **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**: P 9-10.

O

- ❖ **Ollé M., 2002.** Analyse des corps gras. *Bases documentaires : techniques d'analyse ;* Référence P3325 ; Ed. *Techniques de l'ingénieur.* [http://www. Techniques-ingenieur.fr](http://www.Techniques-ingenieur.fr).
- ❖ **Onyeike E.N., Acheru G.N., 2002.** Chemical composition of selected Nigerian oil seeds and physicochemical properties of the oil extracts. *Food Chemistry*, **77**:431-437.

- ❖ **Owen, RW. Mier, W. Giacosa, A. Hull, WE. Spiegelhalder, B. et Bartsch, H. 2000.** Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem.Toxicol*, **38**: P 647-659.

P

- ❖ **Padmaa M.P., 2010.** *Nigella sativa* Linn. - A comprehensive review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. Vol. 1(4):P409-429.

R

- ❖ **Ramadan, M. F., Mörsel, J.T., 2003.** Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrumsativum*L.) and Niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oil seeds. *Food Chemistry*. **80**: P197-204.
- ❖ **Ramadan, M.F., Mörsel, J.T., 2002.** Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Nahrung Food*. **46**: P 240-244.
- ❖ **Randhawa M. A., Al-Akloby O.M., Al-jabre S.H.M., Al-qurashi A.M. and N. AKhtar., 2005.** Thmoquinone, an active principale of *Nigella sativa*, inhibited *Fusarium solani*. *Pak. J. Med. Res.*,**44**: P1-3.
- ❖ **Rey J.F.G.S., 2010.** Détermination des valeurs critiques pour l'antibiogramme vétérinaire par une approche de type Monte Carlo. Thèse pour l'obtention du diplôme docteur vétérinaire. Université de Toulouse, France. P16.
- ❖ **Reylli A. ; Oster M., 2003 .**Guide des annuelles et vivaces. Modus Vivendi, Paris.P12.

S

- ❖ **Salgarolo P., 2003.** Pratique des manipulations de chimie- à l'usage des biologistes. *Techniques et documentation- Lavoisier* : P229-237.
- ❖ **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**: P 107-112.
- ❖ **Sawaya W. N., Dagher N. J. Khan P.2006.** Chemical characterization and edibility of oil extracted from *Citrullus Colocynthis* seed. *Journal of food science*; volume 48, issue 1: 104-106.
- ❖ **Sebbagh N., Cruciani-Gugliemacci C., Ouali F., Berthault M. F., Rouch C. , Chabane sari D . , Magnan C. 2009.** Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oilenriched diet in sterptozotocin induced diabetes in rats. *Diabetes ET Metabolism***35**: 178-184.
- ❖ **Sirois C., 2008.** Valorisation des extraits de pain gris (*Pinusbanksiana*) par l'étude de leurs compositions chimiques et leurs activités biologiques. Mémoire. Université du Québec à Chicoutimi .P14-15 ; 31-33.
- ❖ **Slimane S., 2001.** *Nigella sativa* L., *Nigella damascena* L. ; études botaniques, chimique et pharmacologique. Propriétés des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en pharmacie, Besançon ; n°25-01-33.P12.
- ❖ **Sudjana A.N., D'Orazio C., Ryan V., Rasool N., Justin Ng., Islam N., Thomas V. R., Hammer K.A., 2009.** Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **33**: P 461–463.

T

- ❖ **Takruri H.R.H.; Dameh M.A.F., 1998.** Study of the nutritional value of black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *J.Sci.Food Agric.* **76**: P404-410.
- ❖ **Tanis H., Aygan A and Digrak M.,2009.** Antimicrobial activity of four *nigella* species grown in southern turkey. *Int. J. Agric. Biol***11**: P6.

U

- ❖ **Udayasekhara Rao, P.1994.** Nutrient composition of some less- familiar oil seeds. Food *vitro et in vivo*. Mémoire de Magister. Département des Sciences Biologiques. Faculté des Sciences. Université El-hadj Lakhdar. Batna. P 21-23.

V

- ❖ **Vonarburg. B., 1998.** *Naturlich.* **18**: P65-68.

W

- ❖ **Wichtl M. ; Anton R., 2003.** Plantes thérapeutiques. 2ème édition, Tec & Doc, Tournai (Belgique).P 12.

Annexes

Annexe n°1

Préparation des solutions pour les analyses physico-chimiques

1. Empois d'amidon

1g d'amidon dans 100 ml d'eau distillée tiède.

2. Solution du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 0,001N

Dissoudre 2,48g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dans 1l d'eau distillée.

3. Solution de HCl à 0,5N

Dissoudre 4,180 ml de HCl dans 100 ml d'eau distillée.

4. Solution de KOH à 0,5N

Dissoudre 2,8045g de KOH dans 100 ml d'eau distillée.

5. Solution de thiosulfate de sodium à 0,1 N

Dissoudre 25 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dans un litre d'eau distillée fraîche refroidie.

6. Solution d'iodure de potassium KI à 10%

Dissoudre 10 g d'iodure de potassium KI dans 100 ml d'eau distillée.

Annexe n°2

Tableau n° 07 : Résultats des analyses physico-chimiques de l'huile de coloquinte.

Auteurs et Normes Indices	Echantillon analysé	Littérature (Boublenza I., 2011)	Normes
Densité relative	0,9031	0,909	0,910
Réfraction	1,489	1,474	1,468-1,490
Acide (%)	1,62	3,64	<3,3
Iode (g/ 100g d'huile)	126,9	86	122-129
Saponification	204,801	219	204-206,44
Peroxyde (meq O₂/Kg)	1,9	1,17	<10

Annexe n°3

Tableau n° 08 : Résultats des analyses physico-chimiques de l'huile d'olive.

Auteurs et Normes Indices	Echantillon analysé	Littérature (Boussafi S., 2013)	Normes
Densité relative	0,927		0,910
Réfraction	2,016		1,466-1,468
Acide (%)	2,52	1,7	1-3
Iode (g/ 100g d'huile)	39,88		75-94
Saponification	210,37		185-200
Peroxyde (meq O₂/Kg)	1	4,15	≤ 20

Annexe n°4

Milieux de culture

1. Gélose à Esculine : Esculine iron agar (EIA)

Peptone: 10,0 g

Esculine: 1,0 g

Citrate de fer ammoniacal : 1,0 g

Agar: 20,0 g

pH = 7,4

Préparation : 32 g/ L stérilisation à 121°C/15mn.

2. Gélose Chapman

Trytone 5g

Extrait de viande 3g

Extrait de levure 3g

Chlorure de sodium 7g

Peptone bactériologique 10g

Mannitol 10g

Rouge de phénol 0,05g

Eau distillée qsp 1L

PH = 7,4 à 37°C

Préparation : 119g/L stérilisation à 121°C/15mn.

3. 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.

4. 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.

5. 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 (\pm 0,2) à 37°C

Préparation : 28g/L (chauffage de la solution jusqu'à ébullition) Stérilisation à 121°C /15mn.

6. Gélose Sabouraud

Peptone 10 g

Glucose massé 20 g

Agar-agar 15 g

Eau distillée (qsp) 1 000 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.

7. Bouillon nutritif

Extrait de viande 3g

Peptone 5g

Chlorure de sodium 5g

Eau distillée qsp 1L

PH = 7,2 ($\pm 0,2$) à 37°C

Préparation : 9g/L Stérilisation à 121°C/15mn.

8. Bouillon Coeur Cerveau (BHIB)

Protéose- peptone 10g

Infusion de cervelle de veau 2,5g

Infusion de coeur de bœuf 5g

Glucose 2g

Chlorure de sodium 5g

Hydrogénophosphate de sodium 2,5g

Eau distillé 1000ml

PH = 7,4 ($\pm 0,2$) à 37°C.

9. 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 : $5,7 \pm 0,2$.

10. Eau Physiologique :

Chlorure de sodium 9g

Eau distillée 1000ml.

Annexe n°5

Photos de la microbiologie

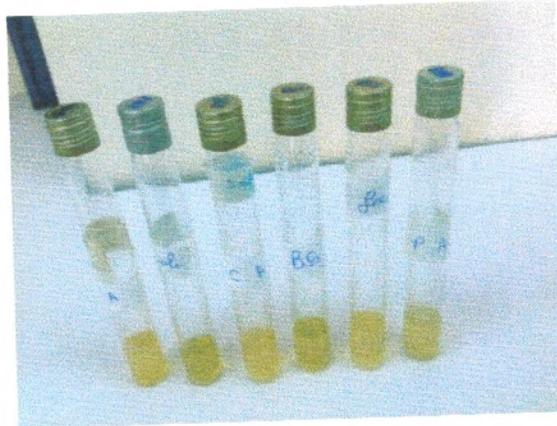


Photo n° 20 : Tubes d'échantillonnage et Souches bactériennes



Photo n°21 : Technique d'écouvillonnage



Photo n°22: Technique des disques

ملخص

اهتمام الانسان بالدهون وكيفية استخدامها يعود لزمان بعيد حيث استخدمها في: الصناعات الغذائية، التجميل، الطب،... الخ. عدة بذور هي مصدر لزيت قيد دراسة خصائصها العلاجية و الغذائية.

في دراستنا، اهتمنا باستخلاص الزيت الثابتة لبذور *Nigella sativa* المسماة *nigelle*. في الجزء الأول من عملنا، ندرس بعد استخلاص الزيت خصائصها الفيزيائية والكيميائية. مقارنة معايير بعض زيوت الطعام مع المذكورة في البحث المكتبي و عينتنا أعطت 0,911 كثافة نسبية، معامل الانكسار منخفض 1,467، معامل حموضة 1,47%، معامل اليود 119,63 غ/100 غ من الزيت، معامل البيروكسيد 7 موز/كغ و معامل التصبن 205,57. كل هذه النتائج موافقة للمعايير. زيت *Nigelle* لها مكونات كيميائية غنية تجعلها مهمة. الجزء الثاني يدرس النشاط المضاد للبكتيريا لزيت *Nigelle* من هذه النقطة الزيت لا تحتوي على أي نشاط فيما يخص *Enterococcus faecalis* و *Candida albicans* لكن كانت لها نشاط متوسط على باقي البكتيريا المدروسة. زيوت الكلمات المفتاحية: *Nigella sativa*، الخصائص الغذائية و العلاجية، الخصائص الفيزيائية و الكيميائية، التركيبة الكيميائية، النشاط المضاد للبكتيريا

Abstract

Always, the man was interested in lipids diverse uses as: the food-processing industry, the beauty care, the medicine, etc. Numerous seeds are sources of oil which are more and more studied for their nutritional and therapeutic properties.

In our work, we were interested in the extraction of the fixed oil of the seeds of *Nigella sativa*, collectively called nigelle.

In the first part of this report, we land, after extraction, the various physico-chemical characteristics of the oil. The comparison of the parameters of certain edible oils with those of nigelle quoted in the literature and our given sample a relative density (0,911), a low(weak) refractive index (IR=1,467), an indication(index) of acid (IA=1,470 %), an indication(index) of iodine (II = 119,63 g / 100g of the oil), an indication(index) of peroxide (IP=7 meqO₂ / kg) and an indication(index) of saponification (IS=205,57). All these values are values in agreement with those of the standards. The oil of nigelle has a rich chemical composition which could make her (it) very interesting.

The second part handles with the evaluation of the antimicrobial activity (antibacterial and antifungal) some oil of nigelle. From this point of view, the oil of nigelle presents no antimicrobial activity saw - in - screw of both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. On the other hand, it had a moderated activity screw - in - screw of the other tested stumps.

Keywords: oil of *Nigella sativa*, , physico-chemical characteristic, chemical composition, antimicrobial activity.

Résumé

De tout temps, l'homme s'est intéressé aux lipides diverses utilisations comme : l'agroalimentaire, la cosmétologie, la médecine, ... etc. De nombreuses graines sont sources d'huiles qui sont de plus en plus étudiées pour leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques (Boublenza I., 2009).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'extraction de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa*, communément appelée nigelle.

Dans la première partie de ce mémoire, nous abordons, après extraction, les différentes caractéristiques physico-chimiques de l'huile. La comparaison des paramètres de certaines huiles alimentaires avec ceux de nigelle cités dans la littérature et notre échantillon a donné une densité relative (0,911), un faible indice de réfraction (IR=1,467), un indice d'acide (IA=1,470%), un indice d'iode (II= 119,63 g/100g d'huile), un indice de peroxyde (IP=7 meqO₂/kg) et un indice de saponification (IS=205,57). Toutes ces valeurs sont des valeurs en accord avec celles des normes. L'huile de nigelle a une composition chimique riche qui pourrait la rendre très intéressante.

La deuxième partie traite de l'évaluation de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) de l'huile de nigelle. De ce point de vue, l'huile de nigelle ne présente aucune activité antimicrobienne vis -à- vis des deux souches *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans*. Par contre, elle a eu une activité modérée vis -à- vis des autres souches testées.

Mots clés: Huiles de *Nigella sativa*, caractéristiques physico-chimiques, composition chimique, activité antimicrobienne.