

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى أسطمبولي

معسكر

Faculté des sciences de la nature e de la vie

Département de biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire

THESE de DOCTORAT en SCIENCES

Spécialité : Sciences de la nature et de la vie

Option : Sciences biologiques

Thème

**Étude biochimique et microbiologique de l'effet *in vivo*
et *in vitro* des huiles essentielles et de l'extrait méthanolique de
la graine de *Nigella sativa* sur les maladies parodontales**

Présentée par : M^{elle} **KIARI Fatima Zohra**

Soutenue le **10 -10- 2019** devant les membres de jury

| | | | |
|---------------------|--|------------|-----------------------------------|
| Président | : M ^r BELABID Lakhdar | Professeur | Université M.S. de Mascara |
| Examinatrice | : M ^m DJAAFRI Ayada | Professeur | Université A.B. d'Oran 1 |
| Examineur | : M ^r BENALI Mohammed | Professeur | Université B.A. de Sidi Bel-Abbés |
| Examineur | : M ^r ABOUNI Bouziane | Professeur | Université B.A. de Sidi Bel-Abbés |
| Encadreur | : M ^r MEDDAH Boumedienne | Professeur | Université M.S. de Mascara |
| Co-Encadreur | : M ^m TIR TOUIL MEDDAH Aicha | Professeur | Université M.S. de Mascara |

Résumé

Une évaluation *in vitro* et *in vivo* a été réalisée sur l'efficacité de l'huile essentielle (HE) et d'extrait méthanolique (EM) des graines *Nigella sativa* L. (El habbah sauda, Sanouj) cultivées en Sahara Algérien (Adrar) contre les maladies parodontales. Le rendement d'extraction de l'HE et d'EM était de l'ordre de 0.45% et 10.9% successivement. Les analyses quantitatives montrent que la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes de l'EM est très élevée. La CCM a révélé que la catéchine, l'acide gallique et la quercétine sont probablement présents dans les deux extraits. Les résultats d'UPLC-SM ont confirmé la présence de plusieurs molécules bioactives dans l'extrait EM des groupes polyphénols et flavonoïdes. L'analyse des extraits, de broyat de la graine et des résidus d'extraction par la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) a détecté la présence de bandes d'absorption des groupements fonctionnels O-H, C-H des polyphénols, C=O et C-O des esters, N-H des amine et C-H des alcanes et des cycles aromatiques. Les résultats de CPG-SM ont confirmé l'efficacité de la technique d'entraînement à la vapeur pour extraire plus de 72% de thymoquinone de l'HE. Les analyses microbiologiques ont permis d'isoler onze bactéries à Gram positif, douze bactéries à Gram négatif et trois souches de levures microscopiques. Les résultats *in vitro* obtenus par micro-dilution montrent que 8250µg/ml en HE est la CMB contre *S. epidermis*, *Lactobacillus sp.* pendant 18 heures, les *E. aerogenes*, *S. maltophilia*, *Porphyromonas sp.* sont les plus sensibles qu'à 16500µg/ml (HE) pendant 48 heures d'incubation tandis que *Porphyromonas sp.* (MBC: 31250µg/ml) et *Proteus sp.* (MBC: 62500µg/ml) étaient les plus sensibles à l'EM au bout de 24h. Cette efficacité n'était pas clairement visible par la méthode de diffusion sur agar. Les résultats de formulation des émulsions montrent que 1.25% et 0.4% en tween 80 sont les proportions idéales pour la préparation des nanoémulsions (*NEs*) d'HE et d'EM respectivement de type huile dans l'eau dont *NEsHE* était la plus stable pendant 60 jours de conservation à 4°C. Les résultats *in vivo* ont montré une activité significative ($P < 0,05$) de *NEsHE* pendant 21 jours de traitement contre la flore totale des gingivites avec une réduction significative en indice de gingivite, indice de plaque ($P < 0,05$) et une activité modérée contre l'indice d'hygiène buccale. L'HE et l'EM de la graine de *N. sativa* récoltées dans le sud Algérien ont montré une excellente activité contre les souches microbiennes isolées de la cavité buccale des malades parodontaux et l'étude *in vivo* a confirmé l'efficacité de *NEsHE* contre le biofilm buccal chez les gingivites.

Mots-clés: Maladie parodontale, *Nigella sativa* L., l'huile essentielle, extrait méthanolique, polyphénols, flavonoïdes, activité antimicrobienne *in vitro*, *in vivo*.

Abstract

Essential oil (EO) and methanolic extract (ME) efficacy of *Nigella sativa* L. seeds (El Habba El sawdae, Sanouj), cultured in the Algerian Sahara (Adrar), against periodontal diseases was performed with an *in vitro* and *in vivo* studies. The extraction yield of EO and ME was in the order of 0.45% and 10.9% successively. Quantitative analyzes showed that the total polyphenol and flavonoïde contents of ME was higher. TLC revealed that catechin, gallic acid and quercetin are probably present in both extracts. The results of UPLC-SM confirmed the presence of several bioactive molecules of polyphenols and flavonoids groups in EM. Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR) of the extracts, crushed seed and extraction residues showed the présence of absorption bands of functional groups, O-H, C-H of polyphenols, C=O and C-O of esters, N-H of amin and C-H of alkanes and aromatic rings. GPC-MS results confirmed the effectiveness of the steam distillation to extracted more than 72% of thymoquinone of the EO from *N. sativa* seeds. Microbiological analyzes resulted the isolation of eleven Gram-positive bacteria, twelve Gram-negative bacteria and three microscopic yeast strains from oral cavities of periodontitis and gingivitis. *In vitro* results obtained by microdilution method showed that 8250µg/ml of EO is the MBC of *S. epidermis*, *Lactobacillus sp.* for 18 hours, *E. aerogenes*, *S. maltophilia*, *Porphyromonas sp.* were more sensitive to 16500µg/ml (EO) for 48 hours of incubation whereas *Porphyromonas sp.* (MBC: 31250µg/ ml) and *Proteus sp.* (MBC: 62500µg /ml) were the most sensitive to ME for 24 hours. This efficacy was not clearly visible by the agar diffusion method. The formulation results of the emulsions showed that 1.25% and 0.4% of tween 80 are the ideal proportions for prepared the nanoemulsions (*NEs*) of EO and ME successively of O/W type, with excellent stability of *NEsHE* stored at 4°C during 60 days. *In vivo* study showed an excellent activity of *NEsHE* during 21days of treatment against total flora (P<0.05) in gingivitis with significant reduction in Gingivite Index, Plaque Index (P<0.05) and a moderate activity against the Oral Hygiene Index. The EO and ME of *N. sativa* seeds harvested in south Algeria showed an excellent activity against isolated microbial strains of the oral cavities of periodontitis and gingivitis while *in vivo* study confirmed the efficacy of *NEsHE* against oral biofilm of gingivitis.

Key words: Periodontal diseases, *Nigella sativa* L., essential oil, methanolic extract, polyphenols, flavonoids, microbial activity *in vitro*, *in vivo*.

ملخص

اعتمدنا في هذا العمل على دراسة فعالية الزيوت العطرية (HE) ومستخلص الميثانول (EM) لبذور *Nigella sativa* L. (الحبة السوداء, السانوج) و المستزرعة في الصحراء الجزائرية ضد أمراض اللثة بإجراء دراسات في المختبر و على الجسم الحي. كان العائد من استخراج HE و EM في حدود 0.45 % و 10.9 % على التوالي. أظهرت التحليلات الكمية أن إجمالي محتويات البوليفينولات والفلافونويدات في EM كان أعلى من HE وكشفت نتائج CCM أن الكاتشين وحمض الغال وكيرستين موجودون في كلا المستخلصين. أكدت نتائج UPLC-SM وجود العديد من المركبات النشطة بيولوجياً من مجموعات البوليفينولات و الفلافونويدات في EM بينما نتائج التحليل بالأشعة تحت الحمراء (IRTF) للمستخلصات ومسحوق البذور وبقيايا الاستخراج اشارت الى وجود العديد من الوظائف الكيميائية ، O-H ، C-H الخاصة بالبوليفينولات ، C = O و C-O التابعة للاسترات ، N-H للأمين و C-H الالكانات والحلقات العطرية. في حين اكدت نتائج GPC-MS فعالية التقطير بالبخار (خارج الموضع الطبيعي) لاستخراج أكثر من 72 % من ثيموكينون الموجود الزيت الطيار المستخلص من بذور السانوج. هذا و أدت التحاليل الميكروبيولوجية إلى عزل إحدى عشرة بكتيريا إيجابية الجرام ، واثني عشر بكتيريا سالبة الجرام وثلاث سلالات خميرة مجهرية. النتائج المخبرية التي تم الحصول عليها بطريقة التخفيف (microdilution) أظهرت أن 8250 ميكروغرام من EO / مل هو CMB ضد *S. epidermis* ، *Lactobacillus sp.* لمدة 18 ساعة ، *E. aerogenes* ، *S. maltophilia* ، *Porphyromonas sp.* كانت أكثر حساسية لـ 16500 ميكروغرام من EO / مل لمدة 48 ساعة ؛ من جهة اخرى و و 31250 و 62500 ميكروغرام من EM / مل) كانت الأكثر فعالية ضد *Porphyromonas sp.* و *Proteus sp.* لمدة 24 ساعة. هذه الفعالية لم تكن واضحة للعيان من خلال طريقة الانتشار على الوسط الصلب (diffusion sur agar). أظهرت نتائج تشكيل المستحلبات أن 1.25 % و 0.4 % من T80 هي النسب المثالية للمستحلبات النانوية (NEs) من HE و EM على التوالي من نوع O / W ، مع استقرار ممتاز لـ *NEsHE* المخزنة عند 4 درجات مئوية خلال 60 يوم. الدراسة التي أجريت على الجسم الحي أظهرت نشاطاً ممتازاً لـ *NEsHE* خلال 21 من العلاج ضد مجموع المكروبات الهوائية ($P < 0.05$) المتسببة في التهاب اللثة مع انخفاض كبير في IPI et IG ($P < 0.05$) ونشاط معتدل ضد IHO. أظهر كل من EO و ME لبذور الحبة السوداء التي تم حصادها في جنوب الجزائر نشاطاً ممتازاً ضد السلالات الميكروبية المعزولة من تجويف الفم لدى مرضى اللثة ، وفي دراسة تطبيقية على الجسم الحي أكدت *NEsHE* فعاليتها ضد الصفيحة الميكروبية لدى اشخاص يعانون من التهاب اللثة.

الكلمات المفتاحية: *Nigella sativa* L. , أمراض اللثة, زيت الطيار, مستخلص ميثانولي, البوليفينولات و الفلافونويدات ,
الفعالية الميكروبية *in vitro, in vivo*

Remerciements

Les travaux de thèse de doctorat exposés ci-après se sont déroulés au Laboratoire de Bioconversion Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (L.B.G.M.S.S.) et au de laboratoire de Recherche sur les Systèmes Biologiques et la Géomatique (L.R.S.B.G.), Université de Mustapha Stambouli de Mascara et les laboratoire pédagogiques de l'université.

Je tiens à remercier, tout d'abord, mon directeur de la thèse **Professeur MEDDAH Boumedienne** pour son encadrement, ses encouragements, ses conseils et pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Un grand respect à ma Co-encadreur **M^m Meddah Tir Touil A.** pour les conseils valeureux et son aide précieuse pour finaliser la thèse et pour m'avoir transmis quelques unes de ses connaissances.

Je remercie les membres de mon jury de thèse pour avoir apporté leurs remarques et leur expertise dans l'examen de mon travail : **M^r BELABID L.**, le directeur de la faculté des sciences de la nature et de la vie, qui a bien voulu présider le jury de cette thèse; **M^m DJAAFRI A.**, **M^r ABOUNI B.** et **M^r BENALI M.** qui mon fait l'honneur d'accepter d'être examinateurs de ce travail et pour avoir participé à ce jury.

J'adresse un grand merci au **Professeur Hamimed**, directeur de laboratoire **L.R.S.B.G** pour son soutien, son encouragement et son aide pour réaliser ce travail.

J'adresse un très grand merci à mon **Professeur Bellil**, directeur de laboratoire **L.G.P.C.S.** faculté des sciences et technologie, Université Mustapha Stambouli de Mascara, pour son participation à ce travail, ses conseils et ses remarques.

Un énorme merci à mes chères collègues : **M^m Aouldmoumna O.** maitre de conférence classe A. pour ses aides et soutiens inestimables, ses conseils et sa participation dans ce travail, **M^m Atma W.** maitre de conférence classe B. , chef département génie des procédés, faculté des sciences technologie, Université Mustapha Stambouli de Mascara pour les conseils et son aide pour compléter ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent aux chirurgiennes dentistes **M^m Sahnouni et M^m Loti, Si Tayab L.** à l'établissement public Mehor Mehiedine, Mascara et la chirurgienne dentiste **M^m Lekhal**, et les chirurgiennes dentistes de l'établissement public cité 400 logement, Mascara.

J'adresse un grand merci aux **M^m Melah R.** maitre de conférence classe B. pour ses aides et sa participation dans ce travail et **M^m Merghoube N.** docteur en phytopathologie au laboratoire MASCIR-Maroc pour ses efforts pour compléter ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à l'ensemble des enseignants qui ont contribué efficacement tout long de cette formation.

Je remercie également les ingénieurs de laboratoires de faculté des sciences et technologie et sciences exacte à l'université Mustapha Stambouli de Mascara: **KheirEddine, Samir, Rachida, Kanza, Soria, Fatima, Houaria** et de l'ensemble du personnel de laboratoire de faculté des sciences de la nature et de la vie : **Si tayab Djaloul, Benchohra M., Mohamed, Mohamed Wahid, Bouafia Daho, Lila, Batouche A.....**

J'adresse aussi mes remerciements à ma famille : ma mère, mes frères **Mohamed, Sofiane et Kkhaled, Amin, Omar, Anes Mohamed El Amine, Yassine Mohamed El Amine**, mes sœurs **khadija, Atika, Khadouj, Sabrina cherifa, Sérine, Nour El Houda** et mes chères amies **Nair S, Alioui L., M^{lle} Righi S., M^{lle} Lakhdari F., Brahmi F. Bakhete N., Megherbi H.**, pour leur soutien et leurs encouragements.

Je tiens donc à remercier tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, m'ont aidé pendant mon travail de thèse. Certaines par leurs conseils et leurs connaissances scientifiques, d'autres par leur soutien et leurs présences dans les moments les plus pénibles **Merci à Tous**

Table des matières

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Liste des annexes

Introduction générale..... 01

Partie bibliographique

Chapitre I : La cavité buccale

| | |
|--|----|
| I.1. Les parois de la cavité buccale | 04 |
| I.2. La langue | 04 |
| I.3. Le parodonte..... | 05 |
| I.3.1. La gencive | 05 |
| I.3.2. Le desmodonte | 06 |
| I.3.3. Le ciment..... | 06 |
| I.3.4. L'os alvéolaire..... | 07 |
| I.4. Les dents | 07 |
| I.4.1. La pulpe dentaire..... | 07 |
| I.4.2. La dentine | 07 |
| I.4.3. L'émail..... | 08 |
| I.5. La salive | 08 |

Chapitre II : Plaque dentaire

| | |
|--|----|
| II.1. Les étapes de formation de la plaque dentaire..... | 11 |
| II.1.1. Formation de la pellicule acquise exogène (PAE) | 11 |
| II.1.2. Adhérence et colonisation bactérienne..... | 11 |
| II.1.2.1. Adhésion réversible..... | 11 |
| II.1.2.2. L'adhésion irréversible spécifique..... | 12 |
| II.1.2.3. Fixation des bactéries pionnières..... | 12 |
| II.1.3. Colonisation et maturation de la plaque dentaire..... | 12 |
| II.1.4. Détachement de biofilm..... | 13 |
| II.2. Classification et la composition bactérienne de plaques dentaires..... | 14 |
| II.3. Architecture de la plaque dentaire..... | 15 |
| II.3.1. Architecture de biofilm supra-gingival..... | 15 |
| II.3.2. Architecture de biofilm sous gingival | 17 |
| II.4. Transformation de la plaque dentaire en tartre..... | 18 |
| II.5. Mécanismes de Resistance du Biofilm | 19 |

Chapitre III: Maladies parodontales

| | |
|---|----|
| III.1. Définition | 20 |
| III.2. La classification des maladies parodontales | 20 |
| III.2.1. Gingivites | 21 |
| III.2.1.1. Différentes formes de gingivites | 21 |
| III.2.1.1.1. Gingivites induites par la présence de la plaque dentaire..... | 21 |
| III.2.1.1.2. Gingivites non induites par la plaque dentaire..... | 22 |
| III.2.1.1.2.1. Gingivites modifiées par des troubles hormonaux..... | 22 |
| III.2.1.1.2.2. Gingivites modifiées par la prise de médicaments..... | 22 |
| III.2.1.1.2.3. Gingivites liée aux infections spécifiques..... | 23 |
| III.2.1.2. Les stades successifs d'une gingivite..... | 23 |
| III.2.1.2.1. La lésion initiale..... | 23 |
| III.2.1.2.2. La lésion débutante..... | 24 |
| III.2.1.2.3. La lésion établie..... | 24 |
| III.2.2. Parodontite..... | 24 |

Table des matières

| | |
|--|----|
| III.2.2.1. Evolution des parodontites..... | 25 |
| III.2.2.2. Classification des parodontites..... | 26 |
| III.2.2.2.1. Parodontite chronique..... | 26 |
| III.2.2.2.2. Parodontites agressives localisées et généralisées..... | 26 |
| III.2.2.2.3. Maladies parodontales chroniques..... | 26 |
| III.2.2.2.4. Parodontite associée aux maladies systémiques..... | 27 |
| III.2.2.2.5. Abscesses parodontaux..... | 27 |
| III.3. Traitement des maladies parodontales..... | 29 |

Chapitre IV: Nigella sativa L.

| | |
|---|----|
| IV.1. Historique..... | 30 |
| IV.2. Le genre <i>Nigella</i> | 30 |
| IV.2.1. La structure de la graine de la <i>Nigella</i> | 31 |
| IV.2.2. <i>Nigella sativa</i> L. | 31 |
| IV.2.2.1. Aspect botanique de <i>Nigella sativa</i> L. | 31 |
| IV.2.2.2. Le semis et la récolte | 32 |
| IV.2.2.3. Composition chimique des graines de <i>Nigella sativa</i> L. | 32 |
| IV.2.2.3.1. Minéraux..... | 33 |
| IV.2.2.3.2. Les protéines | 33 |
| IV.2.2.3.3. Les lipides..... | 34 |
| IV.2.2.3.4. Les métabolites secondaires..... | 35 |
| IV.2.2.3.4.1. Polyphénols et flavonoïdes..... | 35 |
| a) Les polyphénols..... | 35 |
| b) Les flavonoïdes..... | 35 |
| IV.2.2.3.4.2. Les terpènes et saponines..... | 36 |
| a) Les terpènes | 36 |
| b) Les saponines..... | 38 |
| IV.2.2.3.4.3. Les alcaloïdes..... | 40 |
| IV.2.2.3.4.4. Les vitamines..... | 41 |

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

| | |
|---|----|
| I.1. Objectifs..... | 42 |
| I.2. Matériel végétal..... | 42 |
| I.3. Patients..... | 44 |
| I.3.1. Les Patients des tests <i>in vitro</i> | 44 |
| I.3.2. Les patients des tests <i>in vivo</i> | 44 |
| I.4. Méthodes..... | 44 |
| I.4.1. L'extrait sec total..... | 44 |
| I.4.2. Taux de cendre..... | 45 |
| I.4.3. Préparation des extraits de la graine <i>Nigella sativa</i> | 45 |
| I.4.3.1. L'huile essentielle..... | 45 |
| I.4.3.2. Préparation de l'extrait brut méthanolique..... | 46 |
| I.4.4. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes..... | 46 |
| I.4.4.1. Dosage des polyphénols totaux..... | 46 |
| I.4.4.2. Dosage des flavonoïdes | 47 |
| I.4.5. Analyse des extraits de la graine <i>N. sativa</i> par la chromatographie sur couche mince (CCM) | 48 |
| I.4.6. Analyse de l'huile essentielle de la graine <i>N. sativa</i> par la chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (CPG-SM) | 48 |
| I.4.7. Analyse de l'extrait méthanolique de la graine <i>N. sativa</i> par la | |

Table des matières

| | |
|--|----|
| chromatographie liquide Ultra Performante couplée à spectrométrie de masse (UPLC-SM)..... | 49 |
| I.4.8. Analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)..... | 50 |
| I.4.9. Etude <i>in vitro</i> de l'activité biologique des extraits de la graine <i>N. sativa</i> sur la flore buccale des malades parodontaux..... | 50 |
| I.4.9.1. Prélèvement des échantillons..... | 50 |
| I.4.9.2. Recherche, isolement et l'identification des souches microbiennes | 50 |
| I.4.9.2.1. L'enrichissement des prélèvements..... | 50 |
| I.4.9.2.2. L'isolement des espèces microbiennes..... | 51 |
| A)L'isolement des bacilles à Gram négatif..... | 51 |
| B)L'isolement des coques à Gram positif..... | 51 |
| C)L'isolement des bacilles à Gram positif..... | 52 |
| D)L'isolement des bactéries anaérobies à Gram négatif..... | 52 |
| E)L'isolement des levures microscopiques..... | 52 |
| I.4.9.2.3. L'identification des souches microbiennes..... | 53 |
| I.4.9.2.3.1. Identification macroscopique et microscopique..... | 53 |
| I.4.9.2.3.2. Tests biochimiques d'orientation..... | 53 |
| a) Recherche de Catalase..... | 53 |
| b) Test d'oxydase..... | 53 |
| c) Test de mannitol mobilité..... | 54 |
| d) Recherche de Citrate perméase..... | 54 |
| e) Détermination du type respiratoire..... | 54 |
| f) Recherche de Beta galactosidase (test ONPG) | 54 |
| g) Nitrate réductase..... | 54 |
| h) Test de Coagulase..... | 55 |
| I) Test d'hémolyse sanguine..... | 55 |
| I.4.9.2.3.3. Identification des Bactéries par le système Api..... | 55 |
| I.4.9.2.3.4. Identification des levures microscopiques..... | 55 |
| I.4.9.4. La conservation des souches microbiennes..... | 57 |
| I.4.9.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne (<i>in vitro</i>) | 57 |
| I.4.9.5.1. Préparation des solutions des extraits..... | 57 |
| I.4.9.5.2. Revivification et préparation des pré-cultures..... | 58 |
| I.4.9.5.3. Activité antimicrobienne (<i>in vitro</i>) par la méthode de microdilution..... | 58 |
| I.4.9.5.4. Activité antimicrobienne (<i>in vitro</i>) par la méthode de diffusion sur Agar | 58 |
| I.4.10. Formulation des émulsions aux extraits naturels de la graine <i>N. sativa</i> et tween 80..... | 59 |
| I.4.11. Test de résistance des émulsions..... | 59 |
| I.4.12. Examen microscopique des émulsions..... | 59 |
| I.4.13. Étude de stabilité des émulsions de <i>N. sativa</i> | 60 |
| I.4.13.1. Stabilité Physico-chimiques des émulsions de <i>N. sativa</i> | 60 |
| I.4.13.1.1. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur le pH et la conductivité électrique des émulsions..... | 60 |
| I.4.13.1.2. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur la stabilité des émulsions par la spectrophotométrie UV-visible..... | 60 |
| I.4.13.1.3. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des émulsions..... | 61 |
| I.4.13.2. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur la stabilité microbiologique des émulsions..... | 61 |
| I.4.13.3. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur la stabilité macroscopique des émulsions..... | 61 |

Table des matières

| | |
|--|----|
| I.4.14. Application (<i>in vivo</i>) de l'émulsion à base de l'huile essentielle de la graine <i>N. sativa</i> | 62 |
| I.4.14.1. Prélèvement des échantillons et l'analyse microbiologique..... | 62 |
| I.4.14.2. Mesure de pH salivaire..... | 62 |
| I.4.14.3. Examen clinique..... | 62 |
| I.4.14.3.1. Indice gingival | 63 |
| I.4.14.3.2. Indice d'hygiène bucco-dentaire | 63 |
| I.4.14.3.3. Indice de plaque..... | 63 |
| I.4.15. Analyses statistiques..... | 64 |

Résultats et discussion

| | |
|--|-----|
| II.1.L'extrait sec total | 65 |
| II.2.Taux de cendre | 65 |
| II.3.L'huile essentielle..... | 65 |
| II.4.Extrait brut méthanolique..... | 66 |
| II.5.Chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits de la graine <i>N. sativa</i> | 66 |
| II.6.Analyse des l'huiles essentielles de la graine <i>N. sativa</i> par CPG-SM..... | 67 |
| II.7.Analyse de l'extrait méthanolique par la chromatographie liquide Ultra Performante couplée à spectrométrie de masse (UPLC-SM) | 68 |
| II.8.Résultats d'analyse par la Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) | 74 |
| II.9.Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits de la graine <i>N. sativa</i> | 77 |
| II.10.Etude <i>in vitro</i> de l'activité biologique des extraits de la graine <i>N. sativa</i> | 77 |
| II.10.1.Recherche, isolement et l'identification des microorganismes des malades parodontaux..... | 77 |
| II.10.2.Activité antimicrobienne (<i>in vitro</i>) | 81 |
| II.10.2.1.Méthode de microdilution..... | 81 |
| a)Activité antimicrobienne de l'huile essentielle..... | 81 |
| b)Activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique..... | 84 |
| c)Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique sur les levures microscopiques..... | 87 |
| II.10.2.2. Méthode de diffusion sur agar | 88 |
| II.11. Résultats de formulation des émulsions à base des extraits de la graine <i>N. sativa</i> et tween 80..... | 92 |
| II.12. Etude de stabilité des émulsions à base des extraits de la graine <i>N. sativa</i> ... | 93 |
| II.12.1. Résistance des émulsions | 93 |
| II.12.2. Observation microscopique des émulsions..... | 93 |
| II.12.3. Etude de stabilité physicochimique et biochimique des nanoémulsions de <i>N. sativa</i> | 94 |
| II.12.3.1. Effet de température et durée de la conservation sur le pH des nanoémulsions de <i>N. sativa</i> | 94 |
| II.12.3.2. Effet de température et durée de la conservation sur la conductivité électrique des nanoémulsions de <i>N. sativa</i> | 95 |
| II.12.3.3. Effet de température et durée de la conservation sur la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des nanoémulsions de <i>N. sativa</i> | 96 |
| II.12.4. Analyse de stabilité des nanoémulsions de <i>N. sativa</i> par spectrophotométrie UV-visible..... | 98 |
| II.12.5. Effet de température et durée de la conservation sur la stabilité microbiologique des nanoémulsions de la graine <i>N. sativa</i> | 100 |

Table des matières

| | |
|--|------------|
| II.12.6. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur la stabilité macroscopique des émulsions | |
| II.12.7. Résultats d'application <i>in vivo</i> des <i>NEsHE</i>..... | 103 |
| II.12.7.1. pH salivaire..... | 103 |
| II.12.7.2. Effet des <i>NEsHE</i> sur la flore totale (<i>in vivo</i>)..... | 103 |
| II.12.7.3. Effet des <i>NEsHE</i> sur les indices cliniques (<i>in vivo</i>)..... | 105 |
| <i>Conclusion et perspectives</i>..... | 109 |
| <i>Références bibliographiques</i> | |
| <i>Annexes</i> | |

Liste des figures

| | |
|--|-----------|
| Figure n°1: Face supérieure de la langue..... | 05 |
| Figure n°2: Les papilles linguales..... | 05 |
| Figure n°3: Anatomie de la gencive..... | 06 |
| Figure n°4: Anatomie de l'organe dentaire..... | 08 |
| Figure n°5: Représentation schématique de la formation d'un biofilm..... | 13 |
| Figure n°6: Les étapes de formation des plaques dentaires matures..... | 15 |
| Figure n°7: Architecture de biofilm supra-gingival..... | 16 |
| Figure n°8: Architecture de biofilm sous-gingival..... | 18 |
| Figure n°9: Tartre dentaire..... | 19 |
| Figure n°10: Gingivite liée à la plaque bactérienne..... | 24 |
| Figure n°11: Gingivites modifiées par la prise de médicaments..... | 24 |
| Figure n°12: Les évolutions possibles d'une parodontite..... | 26 |
| Figure n°13 : Parodontite chronique..... | 28 |
| Figure n°14 : Parodontite à progression rapide..... | 28 |
| Figure n°15 : Parodontite agressive généralisée..... | 28 |
| Figure n°16 : gingivites nécrotique..... | 28 |
| Figure n°17 : parodontite nécrotique..... | 28 |
| Figure n°18 : Parodontite nécrotique..... | 28 |
| Figure n°19: Parodontite chronique chez un diabetique non equilibre | 28 |
| Figure n°20: Abcès parodontal..... | 28 |
| Figure n°21: Aspect morphologique de la plante <i>Nigella sativa</i> | 32 |
| Figure n°22: Structure des composés phénoliques des extraits de la graine de <i>Nigella sativa</i> | 36 |
| Figure n°23: Composés terpéniques de <i>Nigella sativa</i> L..... | 38 |
| Figure n°24 : Structure chimique de l' α -hederine..... | 39 |
| Figure n°25: Saponines de la graine de <i>Nigella sativa</i> | 39 |
| Figure n°26: Structure des alcaloïdes de <i>Nigella sativa</i> L. | 40 |
| Figure n°27: Plante et graines de <i>Nigella sativa</i> (Qsar Admor, Konta, Adrar- Algérie) | 43 |
| Figure n°28: Plante de <i>Nigella sativa</i> (D'origine de Qsar Admor et plantées à Mascara).... | 43 |
| Figure n°29 : Extraction des huiles essentielle par l'entraînement à la vapeur (<i>ex situ</i>)..... | 45 |
| Figure n°30: Schémas d'identification dichotomique des bacilles à Gram positif..... | 56 |
| Figure n°31: Schémas d'identification dichotomique des bacilles et coques à Gram négatif | 56 |
| Figure n°32: Schémas d'identification dichotomique des coques à Gram positif | 57 |
| Figure n°33: CG-SM Chromathogramme de l'huile essentielle des graines de <i>Nigella sativa</i> (Qsar Konta, Adrar -Algérie) extraite par entraînement à la vapeur (<i>ex situ</i>)..... | 67 |
| Figure n°34 : Résultats d'UPLC-PDA de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne <i>Nigella sativa</i> | 70 |
| Figure n°35: Spectres de masse de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne <i>Nigella sativa</i> (1, 2, 3) | 72 |
| Figure n°36: Spectres de masse de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne <i>Nigella sativa</i> (4, 5, 6) | 72 |

| | |
|---|------------|
| Figure n°37: Spectres de masse de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne <i>Nigella sativa</i> (7, 8, 9) | 73 |
| Figure n°38: Spectres de masse de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne <i>Nigella sativa</i> (10, 11, 12) | 73 |
| Figure n°39: Spectre de masse de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne <i>Nigella sativa</i> (13) | 74 |
| Figure n°40: Résultats de IRTF <i>Nigella sativa</i> | 76 |
| Figure n°41: Effet de l'huile essentielle de la graine de <i>N. sativa</i> sur la croissance des bactéries pathogènes à Gram positif..... | 82 |
| Figure n°42: Effet de l'huile essentielle de <i>N. sativa</i> sur la croissance des bactéries pathogènes à Gram négatif..... | 83 |
| Figure n°43: Effet de l'extrait méthanolique de la graine de <i>N. sativa</i> sur la croissance des bactéries pathogènes à Gram positif..... | 85 |
| Figure n°44: Effet de l'extrait méthanolique de la graine de <i>N. sativa</i> sur la croissance des bactéries pathogènes à Gram négatif..... | 86 |
| Figure n°45: Effet de l'huile essentielle (a,b,c) et d'extrait méthanolique (d,e,f) de la graine <i>N. sativa</i> sur la croissance de <i>C. albicans</i> , <i>Candida sp.</i> et <i>Saccharomyces sp.</i> | 87 |
| Figure n°46: Résultats d'activité antimicrobienne de l'HE et l'EM (méthode de diffusion sur agar) | 88 |
| Figure n°47: Résultats de l'antibiogramme de certaines souches bactériennes pathogènes de la cavité buccale des malades parodontaux..... | 89 |
| Figure n°48: Observation microscopique de <i>NEsHE</i> (a) et <i>NEsEM</i> (b) | 94 |
| Figure n°49 : Effet de la température de conservation sur la stabilité de pH des <i>NEsHE</i> et <i>NEsEM</i> | 95 |
| Figure n°50 : Effet de la température de conservation sur la stabilité de la conductivité électrique des <i>NEsHE</i> et <i>NEsEM</i> | 96 |
| Figure n°51: Effet de la température de conservation sur la stabilité des polyphénols totaux des <i>NEsHE</i> et <i>NEsEM</i> | 97 |
| Figure n°52: Effet de la température de conservation sur la stabilité des flavonoïdes des <i>NEsHE</i> et <i>NEsEM</i> | 97 |
| Figure n°53: Analyse spectrophotométrique des <i>NEsHE</i> de <i>N. sativa</i> | 99 |
| Figure n°54: Analyse spectrophotométrique des <i>NEsEM</i> de <i>N. sativa</i> | 99 |
| Figure n°55: Résultats de dénombrement de la flore totale des <i>NEsHE</i> et <i>NEsEM</i> | 101 |
| Figure n°56: Résultats de dénombrement des levures et moisissures des <i>NEsHE</i> et <i>NEsEM</i> | 101 |
| Figure n°57: Résultats de l'effet de <i>NEsHE</i> sur le pH salivaire (<i>in vivo</i>) | 103 |
| Figure n°58: Effet de <i>NEsHE</i> de la graine <i>N. sativa</i> sur la flore orale des gingivites (<i>in vivo</i>)..... | 104 |
| Figure n°59: Résultats de l'effet de <i>NEsHE</i> sur les indices cliniques des gingivites..... | 106 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----------|
| Tableau n°1: Facteurs affectant la composition et le débit salivaire..... | 09 |
| Tableau n°2: Composition de la salive entière non stimulée et stimulée par la mastication..... | 10 |
| Tableau n°3: Classification des maladies parodontales | 20 |
| Tableau n°4 : Bactéries de la flore présente dans les infections parodontales..... | 27 |
| Tableau n°5: Composition générale de la graine de <i>N. sativa</i> (%)..... | 33 |
| Tableau n°6: La composition minérale de la graine de <i>N. sativa</i> | 33 |
| Tableau n°7: Les acides gras de la graine <i>N. sativa</i> | 34 |
| Tableau n°8: Principaux composés terpéniques isolés de <i>N. sativa</i> | 38 |
| Tableau n°9: Les phases mobiles de la CCM..... | 48 |
| Tableau n°10: Résultats de la CCM..... | 66 |
| Tableau n°11: Composition chimique de l'huile essentielle des graines de <i>N. sativa</i> de Qsar Konta, Adrar (Algérie) extraite par entrainement à la vapeur (ex situ)..... | 68 |
| Tableau n°12: Les souches microbiennes isolées des cavités buccal des malades parodontaux..... | 80 |

Liste des abréviations

| | |
|-----------------------|---|
| - | négatif |
| (%) | pourcentage |
| \ | Par |
| + | Positif |
| ≤ | Inférieur ou égale |
| ≥ | Supérieur ou égale |
| °C | Degré celcius |
| μs/cm | MicroSiemens par centimètre |
| BHI | Cœur cervelle gélosé |
| BHIB | Bouillon cœur cervelle |
| CCM | Chromathographie sur couche mince |
| CMB | Concentration minimale bactéricide |
| CMF | Concentration minimale fongicide |
| CMi | Concentration minimale inhibitrice |
| CO₂ | Gaz dioxyde de carbone |
| CPG-SM | Chromatographie en phase gazeuse couplée spectre de masse |
| DMSO | Dimethyl sulfoxyde |
| DO | Densité optique |
| E.B.M. | Extrait brut methanolique |
| E.S.T. | Extrait sec total |
| EAG | Equivalent d'acide gallique |
| EC | Equivalent catéchine |
| ED | Eau distillé |
| EM | Extrait methanolique |
| EQ | Equivalent quercétine |
| IRTF | Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier |
| g | Gramme |
| h | Heure |
| HE | Huile essentielle |
| IG | Indice gingival |
| IHB | Indice d'hygiène bucco-dentaire |
| IPI | Indice de plaque |
| IT | Indice de tartre |
| jr | Jour |
| L.M.A.E | Laboratoire de Matériaux, Applications et Environnement |
| Log | Logarithme décimal |
| LPC | Lipopolysaccharides |
| MASCIR | Moroccan Foundation for Advanced Science, Innovation & Reserarch. |
| mg | milligramme |
| μg | Microgramme=10 ⁶ gramme |
| ml | millilitre |
| mn | Minute |
| N. | <i>Nigella</i> |
| NEs | Nanoemulsions |

| | |
|----------------|--|
| NEsEM | Nanoemulsions de l'extrait methanolique |
| NEsHE | Nanoémulsions de l'huile essentielle |
| PAE | Formation de la pellicule acquise exogène |
| PAJ | parodontite aiguë juvénile |
| PSE | Polysaccharide extra cellulaire |
| QS | Quorum sensing, |
| R | Rendement |
| SIDA | Syndrome immunodéficience acquis |
| β | bêta |
| T | Témoin |
| t | Temps |
| T (°C) | Température |
| T.C. | Taux de cendre |
| T80 | Tween 80 |
| tr | tour |
| UPLC-SM | Ultra performance chromatographie liquide couplée spectre de masse |
| V | Volume |
| VP | Voges Proskauer |
| α | alpha |
| SP | Spiramycine |
| CZ | Cefazoline |
| ATM | aztréonam |
| L | Lincomycine |
| P | Pénicilline |

Liste des annexes

- Annexes I** : Bulletin d'analyse des huiles essentielles de *N. sativa*
- Annexes II** : Questionnaire en pathologies buccodentaires
- Annexes III** : Identification macroscopique, microscopique et biochimique des souches microbiennes; coloration de Gram et milieu de cultures
- Annexes IV** : Logiciel MESURIM
- Annexes V** : Les extraits de *N. sativa*, Nanoemulsion et la qualité microbiologique des *NEs*
- Annexes VI** : Effet de *NEsHE* sur la flore totale (*in vivo*)



Introduction générale



Introduction générale

La flore buccale constitue un écosystème complexe riche en bactéries avec plus de 700 espèces identifiées (Aas et *al.*, 2005). Il comprend des bactéries à Gram positif et à Gram négatif pouvant être soit des anaérobies facultatives, soit des anaérobies strictes (Aas et *al.*, 2005). Cette flore varie avec l'âge, le site de collection et la situation clinique des patients (Mombelli et *al.*, 1991; Könönen et *al.*, 1994).

La communauté microbienne buccale vit normalement dans un état écologique équilibré et un déséquilibre peut toutefois favoriser l'établissement d'une pathologie (Gendron et *al.*, 2000) qui résulte de la présence de certaines bactéries pathogènes par rapport aux autres espèces (Kornman et Wilson, 1996).

Les infections buccales sont des problèmes de santé publique qui touchent toutes les couches de la population à des degrés divers, dont les plus courantes sont les maladies parodontales. Ces pathologies buccodentaires sont des infections inflammatoires d'origine bactérienne spécifique qui entraîne la destruction des tissus de soutien de la dent et aboutissant à sa perte (Holt et Bramanti, 1991; Amigoni et *al.*, 2000).

Trois personnes sur quatre seraient touchées à divers degrés par cette infection buccale (Bonner, 2001). Elle est influencée par plusieurs facteurs, notamment le tabagisme, les hormones sexuelles, la consommation de drogue, les maladies systémiques, les maladies de la peau d'origine infectieuse ou allergique et le VIH (INSERM, 1999; Denis, 2001). Cependant, au moins quatre conditions doivent être remplies en même temps pour détruits les tissus parodontaux avec ou sans formation de poches ou de perte d'attache: présence de bactéries virulentes, absence de bactéries protectrices, défaillance du système immunitaire, environnement dentogingival défavorable.

La nature infectieuse de la plupart des maladies parodontales et parfois les résultats limités de traitement mécanique conventionnelle justifiaient l'utilisation des antibiotiques. L'utilisation systémique de ces agents antimicrobiens entraîne certains risques, notamment l'apparition de résistances chez diverses espèces bactériennes (Grenier et *al.*, 2007). Par conséquent, la recherche de produits de remplacement isolés à partir de plantes à usage traditionnelle est considérée comme un bon choix alternatif aux produits de synthèse.

Introduction générale

Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent des applications dans divers domaines médicale, pharmaceutique, cosmétique et agricole. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires tels les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles font et reste un objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro* et certaines de ces plantes ont été des sujets de recherches pour leur application potentielle dans la prévention ou le traitement de maladies buccales (Borhan-Mojabi et *al.*, 2012; Shafiei,et *al.*, 2012; Steinberg et *al.*, 2004).

Nigella sativa L. est parmi les plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde, elle est cultivable à plusieurs régions Algérienne et étonnante au passé historique riche et religieux (Goreja, 2003) mais jusqu'à maintenant on n'a pas encore trouvé une application et un investissement scientifique réelle en industrie pharmaceutique.

Dans le cadre de la mise en valeur des graines de *Nigella sativa* L. Algérienne et en contribution de leurs utilisations en industrie pharmaceutique ; dans la présente étude, nous avons tenté de formuler des émulsions antiseptiques aux extraits naturels pour des usages buccaux.

Pour réaliser cet objectif, le présent travail est subdivisé en deux grandes parties : une partie théorique qui englobe et rassemble des données théoriques sur la cavité buccale, la formation de biofilm et son rôle en apparition des maladies parodontales et sur la plante de *Nigella sativa* L. comme source des substances bioactives pour traiter les problèmes liés à la multirésistance de biofilm buccodentaire.

La partie expérimentale englobe deux volets: le matériel et méthodes qui comporte trois étapes:

La préparation et la caractérisation des extraits de la graine de *Nigella sativa* L. par CCM, CPG-SM, UPLC-SM, FT-IR et l'étude de l'activité biologique *in vitro* de l'huile essentielle et d'extrait brut méthanolique de la graine de *N. sativa* sur des souches microbiennes isolées de la cavité buccale des personnes souffrants des pathologies buccodentaires (Gingivites et parodontites).

Introduction générale

Le travail est poursuivi par la préparation des émulsions à base de l'HE et d'EM et l'étude de la stabilité de ces émulsions par l'évaluation de la qualité physicochimique, microbiologique, macroscopique et microscopique durant 60 jours de conservation à différentes températures (4°C, 20°C, 40°C).

Enfin, l'application thérapeutique des émulsions préparées est effectuée sur des patients souffrants des gingivites pour évaluer l'effet de la meilleure formulation sur la plaque dentaire et son impact sur certains indices cliniques.

Le deuxième volet représente les résultats obtenus discutés à la lumière de la littérature. Le travail est achevé par une conclusion et des perspectives.



PARTIE I

Revue bibliographique





Chapitre I

La cavité buccale



La cavité buccale est le premier segment du tube digestif (Kamina, 2006). Elle est irrégulière de volume variable en fonction de l'importance de l'ouverture buccale, divisée en deux parties par les arcades dentaires; le vestibule buccal (En dehors de la cavité), il est recouvert de muqueuse buccale et limité en haut et en bas par les culs de sac vestibulaires, en dedans on trouve la cavité buccale proprement dite (Kamina, 2006; Chevalier et Bonfils, 2001).

I.1. Les parois de la cavité buccale

Dans la cavité buccale on peut distinguer la paroi antérieure constituée par les lèvres qui comprennent une partie cutanée et une partie muqueuse séparées par le limbe. La paroi postérieure est largement ouverte dans l'oropharynx par l'isthme du gosier. Les parois latérales sont formés par les joues qui comprennent une couche musculaire et une autre adipeuse couverte par de la peau en dehors et la muqueuse de la cavité orale en dedans. La paroi inférieure est le plancher oral dont la partie centrale est occupée par le corps de la langue (Chevalier et Bonfils, 2001).

La paroi postéro-supérieure sépare la cavité orale de la cavité nasale, elle comporte une partie antérieure (le palais osseux) qui porte les arcades dentaire supérieure et une partie postérieure (musculaire), mobile (palais mou) (Chevrel et *al.*, 2000).

I.2. La langue

La langue s'attache au plancher buccal. Elle divisé en deux parties par un sillon terminal en forme de V, les tiers antérieurs différant du tiers postérieurs par le développement de la structure et l'innervation (Chevalier et Bonfils, 2001). Elle est constituée principalement de muscles squelettiques et partiellement recouverte par une muqueuse (Gardner et *al.*, 1993). Elle comporte une face ventrale lisse et non kératinisée, et une autre dorsale couverte de papilles impliquées dans le goût (figure n°1) (Trebosc Rouch, 2015).

Les papilles filiformes réparties sur toute la face dorsale de la langue donnant à la langue son aspect râpeux gris rose pâle. Les papilles fongiformes sont beaucoup moins nombreuses, rougeâtres, situées à la pointe de la langue. Les papilles caliciformes situées au

niveau du V lingual, sont volumineuses, elles possèdent des bourgeons du goût sur leurs faces latérales (figure n°2) (Treboss Rouch, 2015; Vacharet, 2008).

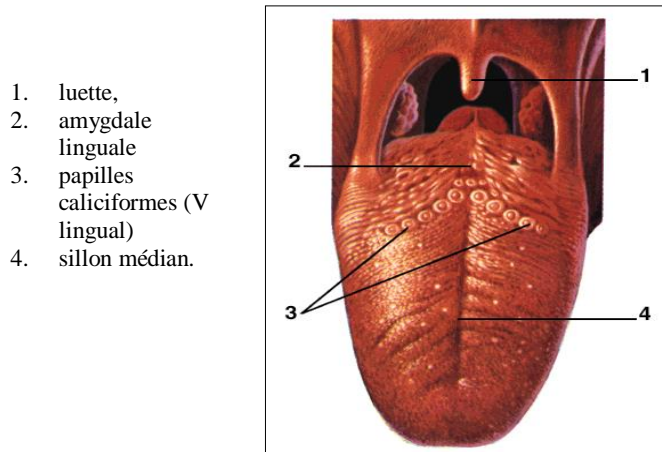


Figure n°1: Face supérieure de la langue (Vacharet, 2008)

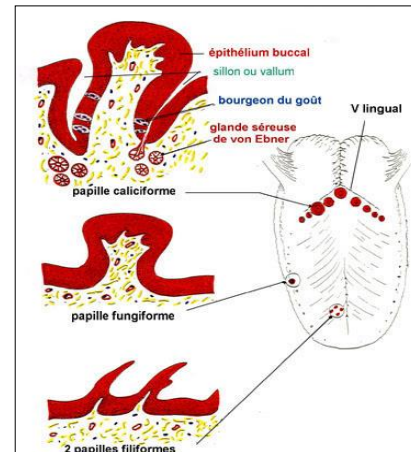


Figure n°2: Les papilles linguales (Vacharet, 2008)

I.3. Le parodonte

L'ensemble des tissus de soutien qui enveloppe les dents, ils comprennent la gencive, le desmodonte (ou ligament alvéolo dentaire), le cément et l'os alvéolaire (Hoceini, 2017; Treboss Rouch, 2015; Bellair, 2015).

I.3.1. La gencive

La gencive est le tissu fibro muqueux de largeur variable qui entoure les dents avec une composition histologique constante composée d'une couche épithéliale basale, à grosses cellules et un tissu conjonctif plus ou moins adhérent à l'os sous -adjacent. Sa couleur est rose pâle, corail chez les personnes de la peau claire, foncée et parfois piquetée de brun chez les individus à la peau mate (Treboss Rouch, 2015; Dumant, 1968). La gencive est sensible aux fortes pressions, irritations physique (compression, courants galvaniques) et aux lésions d'origine chimique (décomposition alimentaire) (Dumant, 1968).

On peut distinguer, la gencive marginale ou libre est la portion de gencive étroite, de couleur rose corail, elle possède une surface unie et une consistance ferme de nature

muqueuse lisse. Elle est séparée de la surface dentaire par un sillon gingivale ou sulcus qui la sépare de la gencive attachée et elle s'adapte à la forme de l'espace entre les dents. La gencive attachée adhère les dents et l'os alvéolaire avec une surface d'un aspect granuleux, Elle s'étend de la gencive libre à la muqueuse alvéolaire (figure n°3) (Treboosc Rouch, 2015).

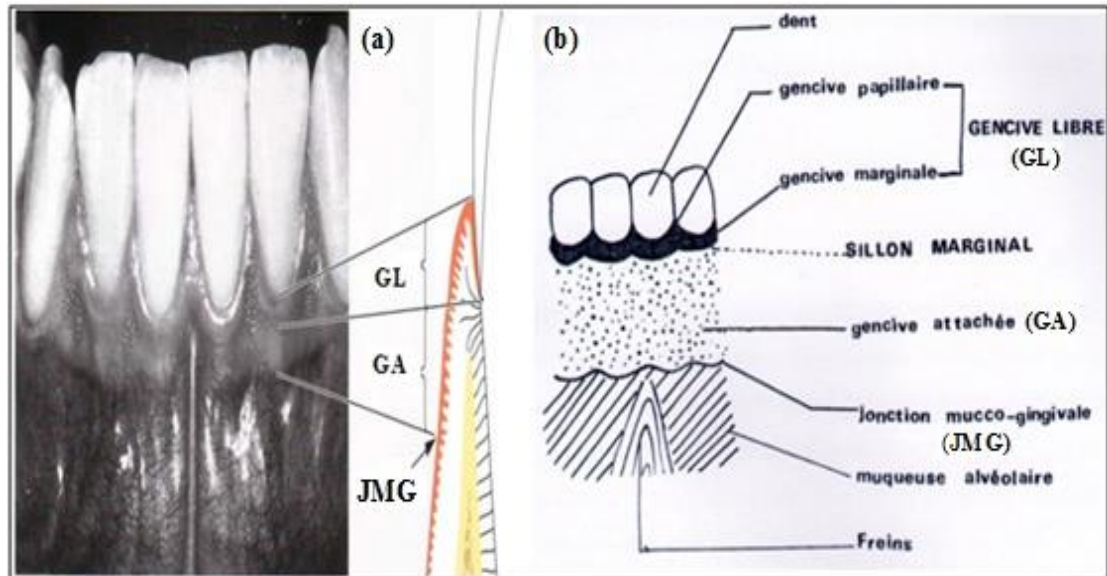


Figure n°3: Anatomie de la gencive selon Lindhe et *al.*(2003) (a) et OPU(1983) (b)

I.3.2. Le desmodonte

Le desmodonte ou le ligament alvéolo-dentaire est un tissu conjonctif fibreux qui entoure les racines des dents et unit le cément et l'os alvéolaire (Lindhe, 1986). Il contient un réseau nerveux qui permet la perception de forces masticatoires, de déplacement dentaire ou de douleur et participe à l'inflammation et à la cicatrisation des tissus du parodonte (Treboosc Rouch, 2015).

I.3.3. Le cément

Le cément est un tissu conjonctif minéralisé, non dissocié du parodonte, il recouvrant les surfaces des racines dentaires et des petites portions de couronne dentaire. Il ne contient ni des vaisseaux sanguins ou les lymphatiques, il n'est pas innervé et ne subit pas de résorption physiologiques ni de remodelage (Lindhe, 1986).

I.3.4. L'os alvéolaire

L'os alvéolaire est un tissu conjonctif calcifié, il constitue avec le cément et les fibres desmodontales, le tissu de soutien de la dent, il est recouvert par la gencive attachée et il est dépendant de la présence des dents (Treboosc Rouch, 2015; Lindhe, 1986). Il permet également le déplacement de la dent et le remodelage osseux (Bellair, 2015; Zannini, 2011).

I.4. Les dents

Les dents sont des structures vivantes et minéralisées, de couleur blanc ivoire, enchâssées dans l'os alvéolaire (Treboosc Rouch, 2015; Amoukoux, 2003). Chaque type de dents (incisive, canine, prémolaire, molaire) se divise en deux parties : une couronne est la partie visible de la dent (au-dessus de la gencive) et une racine non visible, logée dans la gencive, dans une cavité de l'os alvéolaire. Les deux parties sont séparées par le collet (Gardner *et al.*, 1993).

Les différentes faces des dents, les puits et les fissures des surfaces sont des sites susceptibles d'être atteints par la carie dentaire (Azogui-Levy et Boy-Lefevre, 2005). On peut distinguer quatre types de tissus dentaires (figure n°4).

I.4.1. La pulpe dentaire

La pulpe est un tissu conjonctif très vascularisé et innervé comblant la cavité centrale de la dent. Elle joue un rôle physiologique fondamental, elle assure la production de la dentine par les odontoblastes, la nutrition et la sensibilité de la dentine au froid, la chaleur, le sucre, ...etc (Hoceini, 2017; Treboosc Rouch, 2015; Angleraud, 1985).

I.4.2. La dentine ou L'ivoire

La dentine est un tissu conjonctif moins minéralisé et avasculaire, occupe la majeure partie de la dent et entoure la pulpe dentaire de la couronne et de la racine, elle est plus moue que l'émail mais plus dure que l'os ou le cément. Elle est composée de 70% sels de calcium, 12% d'eau, et 18% de matière organique (Treboosc Rouch 2015).

I.4.3. L'émail

L'émail est la couche la plus extérieure de la dent, de couleur blanche, visible. Il recouvre la dentine au niveau de la couronne, il n'est pas innervé ni vascularisé (Treboss Rouch, 2015). Il est composé de 97% de sels de calcium et 3% de matière organique (Vacharet, 2008) ce qui lui confère une sensibilité forte aux acides mais la salive offre une protection à l'émail en tamponnant l'acidité endogène et exogène (Angleraud, 1985).

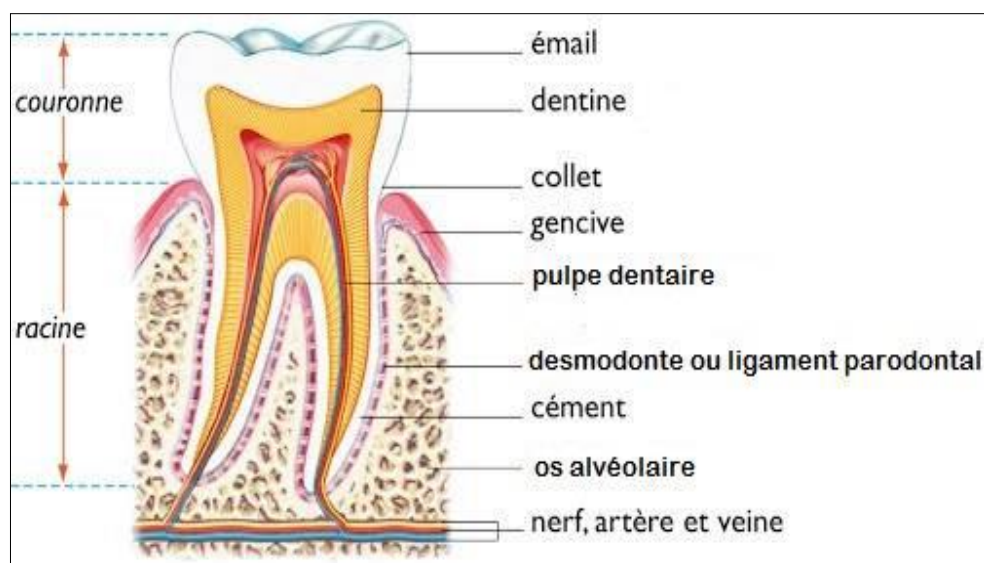


Figure n°4: Anatomie de l'organe dentaire (Treboss Rouch, 2015)

I.5. La salive

La salive est une sécrétion aqueuse produite par trois paires de glandes salivaires principales : les glandes parotides, les glandes sous-maxillaires, les glandes sub-linguales et par de nombreuses petites glandes salivaires accessoires éparpillées dans la paroi de la cavité buccale (lèvres, langue, palais, joues) qui participent à environ 10% de la sécrétion salivaire totale non stimulée. La salive joue un rôle important en protection de la muqueuse buccale et des dents, elle facilite la digestion, l'élocution, réguler le pH buccal par son pouvoir tampon, elle assurée une protection antimicrobiennes et une hydratation de la cavité buccale (Georges, 2012; Edgar et al., 2012).

Des nombreux facteurs (tableau n°1) influent sur la composition et le débit de la salive stimulée (sécrétée généralement en réponse à une stimulation masticatoire ou gustative

ou pharmacologique) et non stimulée (excrétée à l'état de repos, spontanément, en absence de stimulation exogène). Les quantités moyennes de la salive non stimulée est entre 0.3-0.4 ml/min et la sécrétion stimulée peut varier entre 1.5-2.0ml/min dont la composition est différente (tableau n°2) (Edgar et al., 2012).

Tableau n°1: Facteurs affectant la composition et le débit salivaire (Edgar et al., 2012)

| Facteurs affectant la composition salivaire | |
|---|--|
| Espèce | Les hormones |
| Source glandulaire | Grossesse |
| Débit | Polymorphismes génétiques |
| Durée de la stimulation | Stimulateur antigénique |
| Stimulation précédente | Exercice |
| Rythmes biologiques | Drogues |
| Nature du stimulant | Diverses maladies |
| Composition plasmatique (régime alimentaire) | |
| Facteurs affectant le débit salivaire non stimulé chez des sujets en bonne santé | |
| Facteurs majeurs | Facteurs mineurs |
| Degré d'hydratation | Le sexe |
| La position du corps | Age (plus de 15 ans) |
| Exposition à la lumière | Poids |
| Stimulation précédente | Taille de la glande |
| Rythmes circadiens | Effets psychiques - pensée / vue de la nourriture |
| Rythmes Circulaires | Stimulation fonctionnelle |
| Facteurs affectant le débit de la salive stimulé | |
| Stimulants mécanique ; gustatif ; pharmacologique ; la prise de nourriture | Taille de la glande ; Stimulation unilatérale ; Vomissement ; L'olfaction ; Fumeur ; réflexe nauséeux. |

Tableau n°2: Composition de la salive entière non stimulée et stimulée par la mastication (Edgar et *al.*, 2012)

| | <i>Salive non stimulée</i> | <i>Salive stimulée</i> |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| Eau | 99,55% | 99,53% ¹ |
| Solides | 0,45% | 0,47% ¹ |
| | <i>Moyenne ± écart type</i> | <i>Moyenne ± écart type</i> |
| Débit | 0,32 ± 0,23 | 2,08 ± 0,84 |
| pH | 7,04 ± 0,28 | 7,61 ± 0,17 |
| Constituants inorganiques | | |
| Sodium (mmol / L) | 5,76 ± 3,43 | 20,67 ± 11,74 |
| Potassium (mmol / L) | 19,47 ± 2,18 | 13,62 ± 2,70 |
| Calcium (mmol / L) | 1,32 ± 0,24 | 1,47 ± 0,35 |
| Magnésium (mmol / L) | 0,20 ± 0,08 | 0,15 ± 0,05 |
| Chlorure (mmol / l) | 16,40 ± 2,08 | 18,09 ± 7,38 |
| Bicarbonate mmol / L) | 5,47 ± 2,46 | 16,03 ± 5,06 |
| Phosphate (mmol / L) | 5,69 ± 1,91 | 2,70 ± 0,55 |
| Thiocyanate (mmol / L) | 0,70 ± 0,42 | 0,34 ± 0,20 |
| Iodure (µmol / L) | Donnés non disponible | 13,8 ± 8,5 |
| Fluorure (µmol / L) | 1,37 ± 0,76 | 1,16 ± 0,64 |
| Constituants Organiques | | |
| Protéine totale (mg / L) | 1630 ± 720 | 1350 ± 290 |
| Sécrétion IgA (mg / L) | 76,1 ± 40,2 | 37,8 ± 22,5 |
| MUC5B (mg / L) | 830 ± 480 | 460 ± 200 |
| MUC7 (mg / L) | 440 ± 520 | 320 ± 330 |
| Amylase (U = mg de maltose / mL / min) | 317 ± 290 | 453 ± 390 |
| Lysozyme (mg / L) | 28,9 ± 12,6 | 23,2 ± 10,7 |
| Lactoferrine (mg/ L) | 8,4 ± 10,3 | 5,5 ± 4,7 ⁶ |
| Statherine (µmol /L) | 4,93 ± 0,61 | Donnés non disponible |
| Albumine (mg /L) | 51,2 ± 49,0 | 60,9 ± 53,0 |
| Glucose (µmol / L) | 79,4 ± 33,3 | 32,4 ± 27,1 |
| Lactate (mmol / l) | 0,20 ± 0,24 | 0,22 ± 0,17 |
| Lipides totaux (mg /L) | 12,1 ± 6,3 | 13,6 |
| Acides aminés (µmol /L) | 780 | 567 |
| Urée (mmol /L) | 3,57 ± 1,26 | 2,65 ± 0,92 |
| Ammoniac (mmol /L) | 6,86 | 2,57 ± 1,64 |



Chapitre II

Plaque dentaire



Dans la cavité buccale, la salive et le fluide gingival constituent un milieu favorable pour la formation d'une plaque dentaire dite biofilm (Houvion, 2014) qui se définit comme un agrégat bactérien hétérogène colonise les surfaces dentaires près de la gencive marginale et dans l'espace sous-gingival dont les bactéries sont reliées entre elles par une matrice auto-produite polysaccharidique extra cellulaire (PSE) (Hoceini, 2017; INSERM, 1999; Mouton et Robert, 1994). Ce mode de vie spécifique confère généralement aux bactéries des gros avantages par rapport à l'état planctonique (Liu et *al.*, 2016).

II.1. Les étapes de formation de la plaque dentaire

II.1.1. Formation de la pellicule acquise exogène (PAE)

La pellicule acquise exogène est un film protéique fin de 1µm d'origine salivaire dépourvu d'éléments cellulaires et de bactéries, Il se forme spontanément; dans les minutes qui suivent le brossage ; sur les surfaces dentaires par adsorption sélective dont les glycoprotéines salivaires riches en proline se fixent sur les atomes de phosphates et de calcium exposés par les cristaux d'hydroxyapatites des surfaces dentaires (Hoceini, 2017; Houvion, 2014; Bertrand, 2004).

II.1.2. Adhérence et colonisation bactérienne

L'adhérence des bactéries à la pellicule salivaire constitue la première étape dans la colonisation de biofilm buccal, certaines adhésions sont réversibles et d'autres irréversibles. Par cette propriété, les bactéries passent d'un état libre à une organisation en amas plus complexe (Simain et *al.*, 2010).

II.1.2.1. Adhésion réversible

Ce type d'adhésion résulte d'interactions physicochimiques non spécifiques entre les bactéries et PAE en utilisant des forces de Van der Waals et forces de répulsion électrostatiques (Hoceini, 2017; Houvion, 2014). Ces interactions peuvent être établies entre une surface bactérienne chargée négativement et la pellicule par l'intermédiaire de cations divalents tels que les ions de calcium (Ca^{+2}) (Houvion, 2014).

II.1.2.2. L'adhésion irréversible spécifique

Une adhésion irréversible peut s'établir entre la PAE et les bactéries implique des interactions spécifiques et fortes (liaison ioniques, covalentes ou de ponts hydrogènes) entre l'adhésines des surface microbiennes et des récepteurs dans la pellicule exogène acquise (Houvion, 2014; Hoceini, 2017).

Dans ce type d'adhésion, les Glycosyl transférases (GTF) produites par *S. mutans* transforment le saccharose en glycane, très collant, qui se fixe de manière spécifique aux GTF, sur les surfaces des autres streptocoques, ou bien sur des récepteurs de la PEA. On peut trouver également d'autres récepteurs protéiques sur PEA riches en histidine et en proline, des lysozyme et l'alpha-amylase (Bertrand, 2004).

II.1.2.3. Fixation des bactéries pionnières

Les premiers colonisateurs de PEA sont les streptocoques oraux et *Actinomyces spp.*, l'adhérence fait intervenir des interactions non sélectives et sélectives (Berger, 2010). *S. gordonii* et *A. naeslundii* adhèrent aux récepteurs protéiques (Protéines Riches en Proline, PRP) et les autres espèces de streptocoques oraux adhèrent aux récepteurs glycoprotéiques (Bertrand, 2004) tandis que d'autres colonisateurs primaires tels que *Capnocytophaga spp.*, *Eikenella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Prevotella spp.*, *Propionibacterium spp.* et *Veillonella spp.* ont été identifiés (Houvion, 2014), ces espèces dit pionnières sont indispensables pour la fixation ultérieure des autres bactéries de biofilm grâce au changement d'environnement microbien créer par le métabolisme bactérien tel que la synthèse des acides et la consommation d'oxygène et grâce aux adhésines apportées par les colonisateurs primaires (Bertrand, 2004).

II.1.3. Colonisation et maturation de la plaque dentaire

Après quelques minutes de fixation, les bactéries pionnières lancent leur division et d'autres espèces vont colonise le biofilm dentaire, ce phénomène contribue à l'accroissement du biofilm par une adhérence inter-bactérienne et co-adhérence intervenante entre deux bactéries libres ou entre une bactérie libre et une autre déjà fixée successivement (figure n°5).

Cette adhérence résulte d'une interaction spécifique entre une protéine de surface d'une bactérie et le récepteur complémentaire de la bactérie partenaire (Hoceni, 2017; Samot, 2012).

À l'étape de maturation qui correspond à un équilibre du biofilm (maintenue par des phénomènes de mort cellulaire et le détachement de certaines cellules qui peuvent revenir à l'état planctonique), des mécanismes de communications cellulaires (le quorum sensing) ou encore des échanges de matériel génétique entre les espèces peuvent être intervenir (Samot, 2012). A ce stade, la plaque dentaire peut contenir jusqu'à 10^9 bactéries par mg après 2 à 3 semaines en absence de brossage (Samot, 2012; Bertrand, 2004).

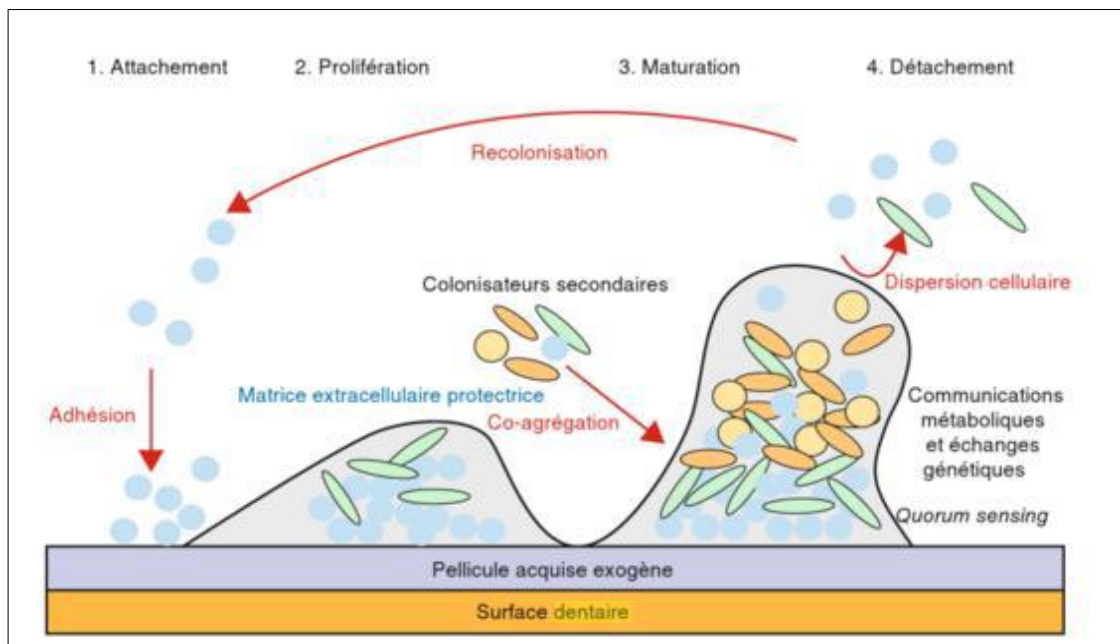


Figure n°5: Représentation schématique de la formation d'un biofilm (Hoceni, 2017)

II.2.4. Détachement de biofilm

Plusieurs auteurs ont rapportés que la formation de biofilm est de nature cyclique sous l'effet d'écoulement hydrodynamique de liquide sur et à travers le biofilm ce qui risque de casser des parties du biofilm. La privation de nutriments, la surexpression de l'alginate lyase, la perte de PSE et QS pourraient être impliqués (figure n°5). Dans ces conditions, les cellules

bactériennes détachées du biofilm rentrent dans l'état planctonique et peuvent se rattacher à des zones vierges et initier un nouveau cycle de formation de biofilm (Pace et *al.*, 2006).

II.2. Classification et la composition bactérienne des plaques dentaires

Selon le lieu de formation du biofilm, on peut distinguer deux types de plaques dentaires, la plaque supra-gingivale qui se forme la première en milieu ouvert sur l'émail dentaire, elle est de couleur blanc-jaunâtre composé principalement de bactéries aérobies et anaérobies facultatives à Gram positif de pouvoir cariogènes dont les *Streptocoques mutans*, *S. salivarius* et *S. sanguinis* sont les plus abondantes. Leurs croissances pouvant déclencher une inflammation gingivale. Cette zone est exposée aux mécanismes d'attrition propres à la cavité buccale telle que la mastication et déglutition et elle est accessible au brossage.

En deuxième temps se forme la plaque sous-gingivales qui colonise le plus souvent milieu fermé, le sillon gingivo-dentaire et les poches parodontales dépourvus d'oxygène, elle est moins adhérente et moins dense que la plaque supra-gingivale. La diversité de biofilm sous gingival permet de créer des complexes bactériens dit de Socransky. Chez les personnes en bonne santé, elle est composée surtout des espèces *Actinomyces* qui constituent le complexe bleu et, en quantités inférieures, on trouve le complexe jaune (espèces *Streptococcus*), le complexe violet (*Veillonella*) alors que le complexe orange (*Fusobacterium*, *Prevotella*, *Campylobacter rectus*) ou le rouge (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) constituent 4% des bactéries totales identifiées (figure n°6) (Houvion, 2014; Bellair, 2015).

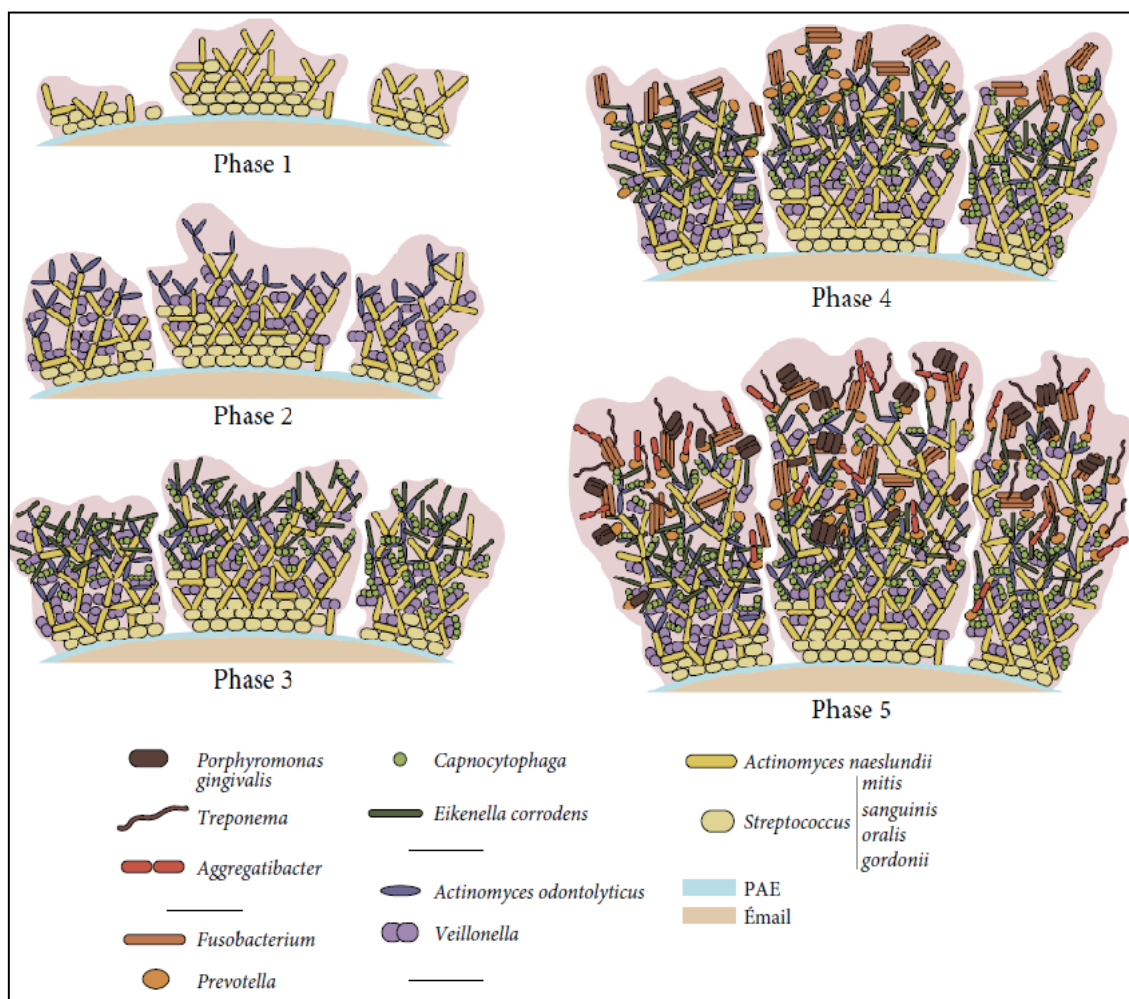


Figure n°6: Les étapes de formation des plaques dentaires matures (Benbelaid, 2015)

II.3. Architecture de la plaque dentaire

II.3.1. Architecture de biofilm supra-gingival

Le biofilm est le mode de croissance le plus approprié pour le développement des pathologies buccodentaires (Seneviratne et *al.*, 2012), Selon Zijngé et *al.*(2010), le biofilm supragingival est d'une architecture hétérogène composé de deux couches différentes. La couche basale adhère à la surface de la dent par quatre types de biofilms différents, le premier est composé uniquement d'*Actinomyces* en forme de bâtonnet, orientées perpendiculairement à la surface de la dent (figure n°7, D). Le second type est un mélange d'*Actinomyces sp.* et des

chaînes de cocci non identifiées comme streptocoques orientées perpendiculairement à la surface de la dent (figure n°7, E). Le troisième biofilm composé des bactéries filamenteuses et des streptocoques qui forment une colonie distincte autour des cellules de levure (figure n°7, F). Le quatrième type est un biofilm composé principalement de streptocoques poussant à proximité de *Lactobacillus sp.* qui sont orientés perpendiculairement à la surface de la dent (figure n°7, G).

La deuxième couche se trouve au-dessus des biofilms de la couche basale. Les *Streptococcus sp.* peuvent être présente de manière dispersée sans aucune organisation apparente (figure n°7, A3), ou elles alignées sur le dessus de la deuxième couche de biofilm sous la forme d'une couche mince (figure n°7, A1), elles colonisent également les fissures dans le biofilm (figure n°7, A2). En outre, il existe une diffusion hétérogène de cellules bactériennes appartenant au groupe Cytophaga-lavobacterium-Bacteroides cluster (CFB-cluster) (figure n°7, B) et sur la surface de la dent on trouve des *Lactobacillus sp.* entourées par des cellules de différentes formes (figure n°7, C).

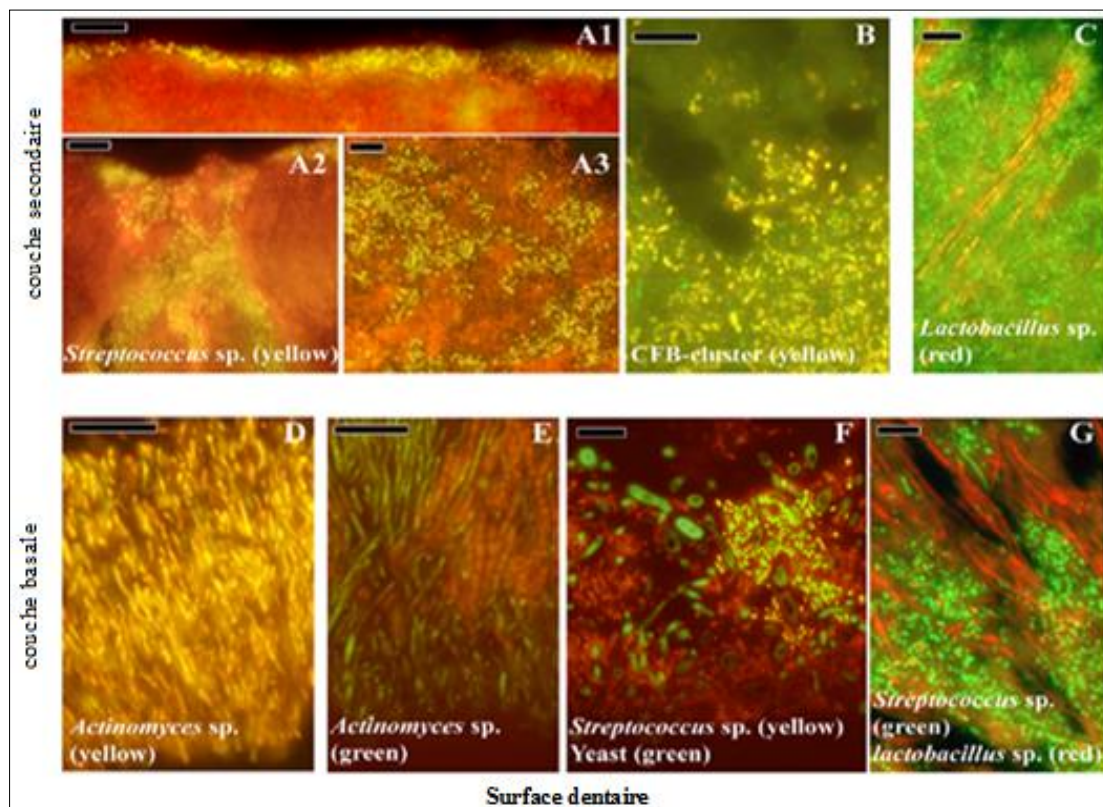


Figure n°7: Architecture de biofilm supra-gingival (Zijnge et al., 2010)

II.3.2. Architecture de biofilm sous gingival

Selon le rapport de Zijng et *al.*(2012), on peut distinguer trois zones différentes entre la surface de la racine des dents et la muqueuse gingivale de la poche parodontale, Dans la zone directement adhérente à la surface radiculaire, on trouve des Actinobactéries et d'autres bactéries de différentes formes non identifiées, au-dessus on trouve, la couche intermédiaire contient des bactéries distinctives de forme filamenteuse ou bâtonnet, sans matrice intercellulaire bien définie comme *Fusobacterium nucleatum* et *Tannerella forsythia*, la partie la plus externe du biofilm adhérente qui fait face au tissu gingivale constituée d'un ou plusieurs gros filaments centraux entourés par des bâtonnet à gram-négatifs ou par de petits filaments.

Des cellules orientées parallèlement ont été identifiées, on peut distinguer également une couche supplémentaire de bactéries couvrant le biofilm sans organisation cellulaire claire dont les cellules flagellées et spirochètes appartenant aux espèces *Selenomonas* et *Treponema* sont les plus abondantes. *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* et *Parvimonas micra* ont été également identifiées dans le biofilm sous-gingival (figure n°8).

Dans un parodonte sain, les sites de fixation des bactéries ne sont pas accessibles alors qu'une accumulation de biofilm au niveau de la marge gingivale et dans le sulcus gingival et une absence d'hygiène bucco-dentaire abouties à une pathologie buccodentaire (gingivite ou une parodontite) (Zijng 2012 ; Basri et *al.*, 2012).

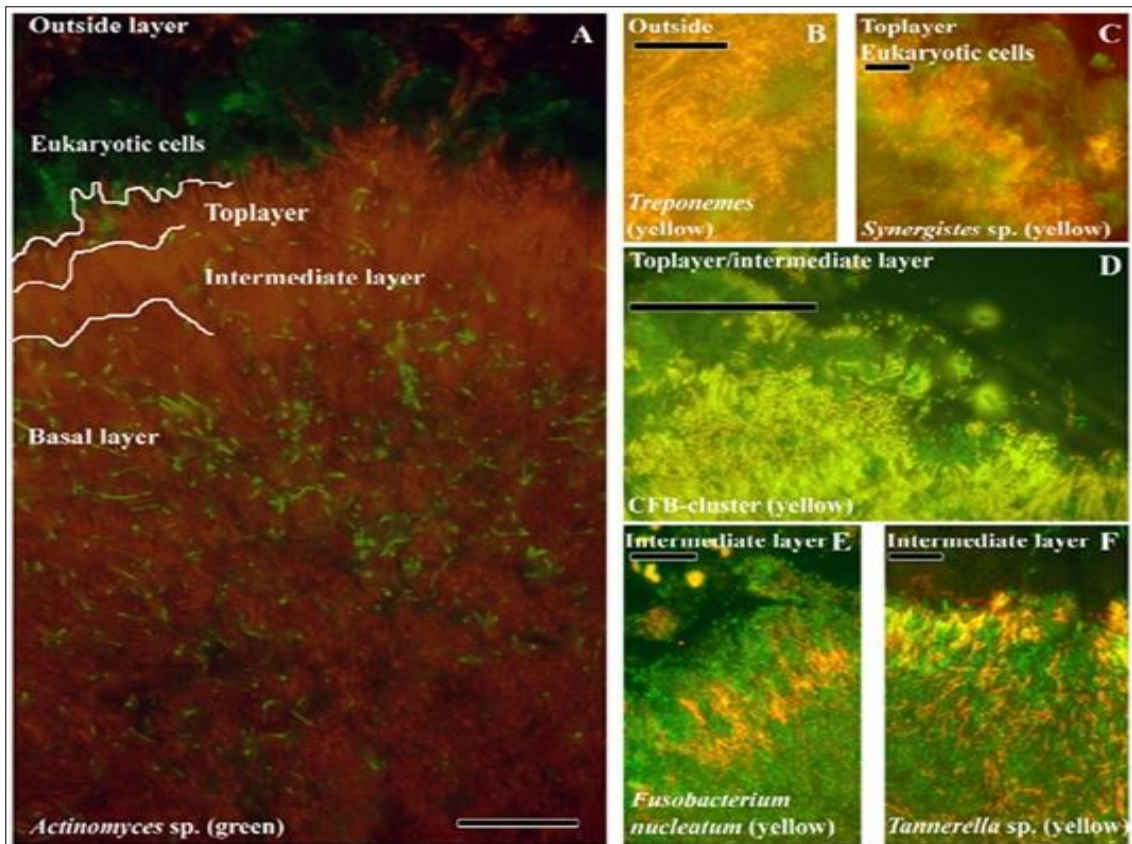


Figure n°8: Architecture de biofilm sous-gingival (Zijngel et al., 2010)

II.4. Transformation de la plaque dentaire en tartre

En absence d'hygiène buccale, une substance dure se forme aux surfaces dentaires dit tartre, elle résulte d'une calcification de la plaque dentaire par des phosphates de calcium d'origine salivaire (Treboosc Rouch, 2015).

Le métabolisme bactérien favorisant la formation du tartre dont la sécrétion d'urée et une perte de CO₂ créent un pH salivaire alcalin ce qui favorise la précipitation des ions de calcium, la synthèse de phosphatases provoque l'hydrolyse des phosphates organiques salivaires en phosphates inorganiques. Les acides phospholipidiques des membranes bactériennes sont nécessaires à la calcification, ils sont liés au calcium et forment un complexe calcium-phospholipide-phosphate sous forme des cristaux (Treboosc Rouch, 2015; Bellair, 2015, Houvion, 2014). Il semblerait que même des cellules épithéliales, des globules graisseux, des leucocytes et des bactéries (*Streptocoque salivarius*, *Actinomyces israelii*,

Actinomyces naeslundii et *Corynebacterium matruchotii*) peuvent être intervenir en formation du tartre (Houvion, 2014).

Selon le lieu de localisation on peut distinguer le tartre supragingival est de couleur claire, crème à jaune, parfois noirci par la nicotine ou d'autres colorants, il se trouve au-dessus de la marge gingivale, sur la partie visible de la dent (figure n°9). Le tartre sous-gingival, de couleur va du brun au noirâtre, se développe sur toutes les dents, en faces linguale et proximale, sous la gencive et sur le cément ce qui favoriser la survenue de maladies parodontales (Treboss Rouch, 2015; Bellair, 2015).



Figure n°9: Tartre dentaire (Treboss Rouch, 2015)

II.5. Mécanismes de Resistance du Biofilm

Le biofilm constitue un environnement protecteur aux bactéries contre les antibiotiques, antiseptiques et les désinfectants ce qui provoqué l'émergence de la résistance naturelles et acquises des bactéries après un usage abusif de ces agents antimicrobiens, certaines bactéries peuvent neutraliser ou produire une enzyme de dégradation des antibiotique tel que la bêta lactamase excrètent par les Gram positif dans leur environnement proche.

La co-adhérence (homotypique ou hétérotypique) peut empêchée la pénétration des agents antimicrobiens, ralentie le métabolisme des bactéries les plus proches du support et favorise les échanges nutritionnels, métaboliques et génétique (Houvion, 2014; Benbelaid, 2015). En cas des entérocoques, la co-adhérence possède une tendance importante d'accueillir et de transférer des éléments génétiques mobiles notamment la transmittance du gène de la résistance à Vancomycine d'*E. faecalis* vers *S. aureus* (Benbelaid, 2015).



Chapitre III

Maladies parodontales



III.1. Définition

Les maladies parodontales sont des pathologies buccale d'origine infectieuse commune avec prévalence allant de 10 à 60% (Vogt et *al.*, 2012), elles représentent le désordre inflammatoire chronique de l'adulte, d'origine microbienne limitées à la gencive libre (gingivite) ou affectant l'ensemble des tissus de support de la dent (la parodontite) qui déclenchent des inflammations innées et des réponses immunitaires adaptatives (Silva et *al.*, 2015 ; Grenier et *al.*, 2007).

III.2. La classification des maladies parodontales

Plusieurs classification ont été proposées sur les maladies parodontales selon leur cause, niveau d'atteinte parodontale, les formes cliniques ou le mode de traitement (Akatschi Ohamamboya, 2013; Picard, 2004) mais elles comportent certains chevauchements entre les différentes catégories de maladies. En 1999, l'Académie Américaine de Parodontologie (AAP) a diminuée ce chevauchement entre les différentes catégories de maladies parodontales par le développement d'une nouvelle classification (tableau n°3)(Genco et Williams,2010).

Tableau n°3: Classification des maladies parodontales révisée en 1999 par l'Académie Américaine de Parodontologie (Genco et Williams, 2010)

| | |
|--------------|--|
| I. | Maladies gingivales |
| | A. Maladies gingivales induites par la plaque |
| | B. Maladies gingivales non induites par la plaque |
| II. | Parodontite chronique |
| | A. Localisée |
| | B. Généralisée |
| III. | Parodontite agressive |
| | A. Localisée |
| | B. Généralisée |
| IV. | Parodontite associée aux maladies systémiques |
| | A. Association aux désordres hématologiques |
| | B. Association aux désordres génétiques |
| | C. Association aux désordres non-spécifiques |
| V. | Maladies parodontales chroniques |
| | A. Gingivite ulcéro-nécrotique |
| | B. Parodontite ulcéro-nécrotique |
| VI. | Abcès du parodonte |
| | A. Abcès gingival |
| | B. Abcès parodontal |
| VII. | Lésions endodontiques parodontales |
| VIII. | Conditions et difformités acquises ou de développement |

*PAC : perte d'attache clinique

III.2.1. Gingivites

La gingivite est un phénomène réversible relativement courant résulte de la réaction inflammatoire non spécifique induite par l'accumulation de la plaque dentaire au niveau de la gencive marginale (Genco et Williams, 2010; Grenier et *al.*, 2007; Houle et Grenier, 2003).

Elles se traduisent par une rougeur de la gencive, un saignement, un œdème localisé et une sensibilité gingivale (Picard, 2004; INSERM, 1999). Elles sont dues, essentiellement, à des substances dérivées de la plaque microbienne qui s'accumule près du sulcus gingival (INSERM, 1999).

Chez les personnes saines, l'épithélium sulculaire et jonctionnel sont intacts, ils constituent une barrière naturelle et efficace en empêchement d'entrer des bactéries aux tissus hôtes. Cependant, plusieurs parodontopathogènes, des composants (lipopolysaccharide, peptidoglycane) et des produits bactériens (protéases, toxines) peuvent traverser les cellules épithéliales et accéder au tissu conjonctif (Genco et Williams, 2010). Silva et *al.* (2015), ont ajouté que cette interaction hôte/bactéries induit la production de cytokines et des chimiokines par l'épithélium gingival, entraînant l'expression de molécules d'adhésion, une perméabilité accrue des capillaires gingivaux et un chimiotactisme des neutrophiles polymorphonucléaires à travers l'épithélium jonctionnel et dans le sulcus gingival. La gingivite établie peut rester stable ou évoluer vers la parodontite (Piette et Mahy, 2005).

III.2.1.1. Différentes formes de gingivites

III.2.1.1.1. Gingivites induites par la présence de la plaque dentaire

Cette forme de maladie gingivale est la plus courante dont 75 à 95 % des adultes sont concernés. Elle associée à une accumulation de la plaque et de tartre, se manifeste par une rougeur, œdème et sensibilité de la gencive avec un saignement spontané ou provoqué au sondage sans perte d'attache ou atteinte osseuse (figure n°10) (Genco et Williams, 2010; Duyninh, 2005).

La plaque dentaire est composée principalement de bactéries à Gram Positif (60 %) dont les *Actinomyces sp.* et *Streptococcus sp.* (tableau n°4), sont les plus fréquentes avec la

présence, en faible pourcentage, des bacilles à Gram négatif, anaérobies stricts (Orti et *al.*, 2004).

III.2.1.1.2. Gingivites non induites par la plaque dentaire

Ces types de lésions sont généralement rares et principalement en raison de conditions systémiques, sont d'origine hormonale, médicamenteuse ou infectieuse. Des lésions gingivales peuvent également être causées par des désordres génétiques muco-cutanés systémiques, des réactions allergiques, des traumatismes ou des lésions à un corps étrangers (Genco et Williams, 2010; Duyninh et *al.*, 2005).

III.2.1.1.2.1. Gingivites modifiées par des troubles hormonaux

Elle est probablement dû à une variation des taux de progestérones et/ou d'oestrogènes (tel que l'usage d'un contraceptif oral) (Le Piouff, 2006), elles ont les mêmes caractéristiques clinique qu'une gingivite induite par la plaque bactérienne alors que le sillon gingivodentaire est plus chargée en germes anaérobies, principalement *Prevotella intermedia*, *Bacteroides melaninogeniens* et *Bacteroides gingivalis* (Duyninh et *al.*, 2005).

III.2.1.1.2.2. Gingivites modifiées par la prise de médicaments

Certains médicaments ont des effets secondaire sur la santé gingivale et peuvent induit des hyperplasies gingivale, c'est une multiplication excessive des fibroblastes et une augmentation de la synthèse du collagène au niveau gingival (figure n°11).

Les médicaments en cause sont généralement les préparations de la classe des phénytoïnes (médicament indiqué en certaines maladies épileptiques), la ciclosporine A (un immunosuppresseur) et la nifédipine, un antagoniste du calcium (médicament d'hypertension artérielle et la maladie cardiaque coronarienne). L'insuffisance d'hygiène buccale et d'autres facteurs d'irritation locale (bords insuffisants de restaurations dentaires) peuvent également favorisés le développement de l'hyperplasie gingivale (Breitung et Remmerbach, 2010).

III.2.1.1.2.3. Gingivites liée aux infections spécifiques

Selon Genco et Williams (2010), des infections par *Neisseria gonorrhoeae* (gonorrhée), *Treponema pallidum* (la syphilis) transmissibles sexuellement et une infection par le virus de l'herpès simplex de type I peuvent causés des lésions gingivales alors que l'infection fongique la plus courante chez les patients portant une prothèse dentaire et des bouches sèches est la candidose causée par *Candida albicans* en raison de multiples médicaments ou d'un dysfonctionnement des glandes salivaires.



Figure n°10: Gingivite liée à la plaque bactérienne (Duyninh et *al.*, 2005)



Figure n°11: Gingivites modifiées par la prise de médicaments (Breitung et Remmerbach, 2010)

III.2.1.2. Les stades successifs d'une gingivite

À la suite de l'accumulation de plaque, on peut distinguer trois stades successifs d'une gingivite.

III.2.1.2.1. La lésion initiale

Après deux à trois jours de cessation de l'hygiène, la gingivite se manifeste par une réaction inflammatoire vasculaire résultante de la libération de substances chimiotactiques et antigéniques produites par les bactéries de la plaque accumulée. Une infiltration des neutrophiles suivie par celle des lymphocytes est caractéristique de ce stade. La concentration des leucocytes s'acroît du tissu conjonctif vers le sulcus gingival en passant par l'épithélium de jonction (Lindhe et *al.*, 2003; Le Piouff, 2006, Gildas, 2005). On a aussi une disparition de 60 à 70 % de collagène périvasculaire du tissu conjonctif ainsi que celui situé dans la partie coronaire de l'épithélium de jonction (Le Piouff, 2006).

III.2.1.2.2. La lésion débutante

Cliniquement, la lésion débutante apparaît après sept à quatorze jours de l'accumulation de la plaque, elle se traduit par un saignement au sondage (Gildas, 2005). A ce stade l'infiltration leucocytaire est constituée essentiellement de lymphocytes T, elle comporte également les neutrophiles, lymphocytes, plasmocytes, macrophages et mastocytes (Gildas, 2005; INSERM, 1999). Le nombre élevé de neutrophiles migrés à travers l'épithélium de jonction vers le sillon peut disloquer l'architecture de ces cellules. Une altération morphologique et cytotoxique des fibroblastes peut être détectée, la production de collagène est fortement diminuée (Le Piouff, 2006) et à la fin de la deuxième semaine, on peut détecter un biofilm sous-gingival (Lindhe, 2003).

III.2.1.2.3. La lésion établie

L'infiltrat inflammatoire se caractérise par la prédominance des cellules plasmatiques, des cellules T et B qui envahissent le tissu conjonctif gingival et autour des vaisseaux. La destruction du collagène se poursuit sous l'attaque, à la fois d'enzymes protéolytiques produites par les bactéries de la plaque et par d'autres enzymes catalytiques (protéases et élastase) sécrétées par les cellules inflammatoires (figure n°12). A ce stade, le tissu gingival subit des modifications morphologiques et fonctionnelles, l'oedème tissulaire favorise la formation d'une flore bactérienne sous-gingivale (Peyret-Lacombe, 2007; Gildas, 2005; Lindhe et *al.*, 2003).

De façon concomitante, le sillon gingivo-dentaire s'approfondit, l'épithélium de jonction n'adhérant plus à la surface dentaire sans migration apicale de l'épithélium de jonction, ou perte osseuse (Le Piouff, 2006). Ce type de lésion peut être stable pendant des périodes indéfinies (Peyret-Lacombe, 2007) ou vont évoluer et devenir des parodontites (INSERM, 1999).

III.2.2.Parodontite

La parodontite est une lésion inflammatoire d'origine infectieuse entraîne la destruction des tissus de soutien de la dent (Amigoni, 2000). Environ 500 espèces microbiennes sous-gingivales agissent en coopération et en synergie pour initier les

parodontites dont la majorité sont des bactéries anaérobies à Gram négatif (Silva *et al.*, 2015). Elles produisent une grande variété de facteurs de virulence leur permettant de résister aux mécanismes de défense de l'hôte (Grenier *et al.*, 2007) et selon Picard (2004), la présence de tartre peut également intervenir en apparition d'une parodontite.

III.2.2.1. Evolution des parodontites

Cliniquement la parodontite se traduit par la formation d'une poche parodontale invisible créée par une migration apicale de l'attache épithéliale le long de la surface radiculaire ou par une destruction visible de l'épaisseur de la gencive en direction de la racine de la dent (figure n°12) et la plus grave conséquence est la perte d'os alvéolaire qui peut provoquer une augmentation de la mobilité des dents et conduire à leur perte avec le temps (Beltrán-Aguilar *et al.*, 2012; Piette et Mahy, 2005; Picard, 2004).

Cette pathologie se manifeste par une accumulation de tartre, de rougeurs, inflammation, gonflement et luisance de la gencives avec un saignements abondant au moindre toucher (Beltrán-Aguilar *et al.*, 2012; Bercy et Tenenbaum, 1996).

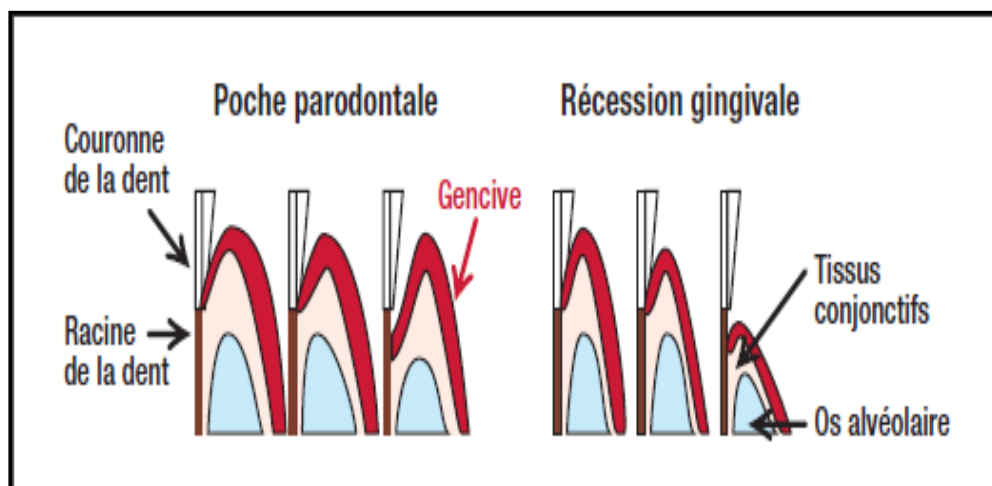


Figure n°12: Les évolutions possibles d'une parodontite (Picard, 2004)

III.2.2.2. Classification des parodontites

III.2.2.2.1. Parodontite chronique (*Anciennement parodontite de l'adulte*)

La parodontite chronique est la forme la plus fréquente de cette pathologie, elle affecte des sujets de tout âge (enfants, adolescents, adultes) avec un taux de progression lent (perte d'attache entre 1 et 2 mm), modéré (perte d'attache entre 3 et 4 mm) à sévère (perte d'attache est supérieure ou égale à 5 mm) (figure n°13). La lésion peut atteindre moins de 30 % de sites (Parodontite chronique localisée) ou plus de 30 % de sites sont concernés en cas de parodontite chronique généralisée (Duyninh et *al.*, 2005).

La parodontite chronique est généralement associée par la présence de plusieurs espèces pathogènes (AFSSAP, 2011) dont les plus dominantes l'*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* et *Bacteroides forsythus* (Orti et *al.*, 2004).

III.2.2.2.2. Parodontites agressives localisées et généralisées (*Anciennement parodontite à progression rapide*)

Elles comportent les formes de parodontites caractérisées par une destruction osseuse agressive et une perte d'attache rapide (figure n°14,15). On peut distinguer la parodontite agressive localisée (parodontite juvénile localisée) caractérisée par la présence *Actinobacillus actinomycetemcomitans* et la parodontite agressive généralisée (parodontite juvénile généralisée) se caractérise par présence une association de *Porphyromonas gingivalis* et d'autres bacilles à Gram négatif (tableau n°4) (Orti et *al.*, 2004).

III.2.2.2.3. Maladies parodontales chroniques

Les gingivites ulcéro-nécrotique (GUN) et la parodontite ulcéro-nécrotique (PUN) sont classées comme des maladies parodontales nécrosantes. Elles sont probablement des stades différentes de la même infection et signes cliniques (Genco et Williams, 2010). Les GUN et PUN affectant les tissus parodontaux superficiels et le parodonte profond successivement (figure n°16, 17, 18) (Duyninh et *al.*, 2005).

Ce type de pathologie est associé par une diminution de la résistance systémique des tissus parodontaux aux infections bactériennes (Lindhe et *al.*, 2003) composées principalement de *Fusobacterium spp.*, spirochètes (*Treponema spp.*), *Prevotella intermedia* et *Selenomonas sp.*(Arveux, 2016; AFSSAP, 2011; INSERME,1999).

| Tableau n°4 : Bactéries de la flore présente dans les infections parodontales (AFSSAP, 2011) | | | |
|--|--|---|--|
| Gingivite associée à la présence de plaque dentaire | Maladies parodontales nécrosantes | Parodontite agressive localisée | Parodontite agressive généralisée |
| <i>Actinomyces gerencseriae</i> <i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Campylobacter gracilis</i> <i>Capnocytophaga gingivalis</i> <i>Capnocytophaga sputigena</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Leptotrichia buccalis</i> <i>Neisseria mucosa</i> <i>Parvimonas micra</i> (<i>Peptostreptococcus micros</i>) <i>Prevotella spp.</i> Spirochètes (<i>Treponema spp.</i>) <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus sanguinis</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Veillonella parvula</i> | <i>Fusobacterium spp.</i> Spirochètes (<i>Treponema spp.</i>) <i>Prevotella intermedia</i> <i>Selenomonas spp</i> | <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Treponema denticola</i> <i>Campylobacter gracilis</i> <i>Eubacterium nodatum</i> | <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> <i>Anaeroglobus geminatus</i> <i>Campylobacter rectus</i> <i>Capnocytophaga granulosa</i> <i>Dialister invisus</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Selenomonas spp.</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Treponema denticola</i> <i>Treponema lecithinolyticum</i> |

III.2.2.2.4.Parodontite associée aux maladies systémiques

Des parodontites pouvaient être une manifestation de certaines maladies systémiques tel que leucémies, neutropénies acquises (maladies hématologiques), l'ostéoporose, les déficits hormonaux en œstrogènes, syndrome de Down et neutropénies cycliques et familiales (maladies génétique) (Peyret-Lacombe, 2007).

Chez les diabétiques, l'ensemble des perturbations métaboliques peuvent augmentées le risque de développement des parodontites et la destruction plus sévère du parodonte (figure n°19). Ce type de parodontite peut également être associé à une infection par le VIH, une immunodépression ou une malnutrition (Duyninh et *al.*, 2005).

III.2.2.2.5.Abcès parodontaux

L'abcès parodontal est une infection purulente localisée des tissus parodontaux, généralement, il se développe chez les parodontites pouvant avoir des débris logés dans une

poche ou dépôts profonds de tartre. Il peut également survenir dans les tissus parodontaux sains en raison de la présence de corps étrangers logés dans la crevasse gingivale (Genco et Williams, 2010). Il se caractérise par une gencive rouge, lisse, gonflée et mobilité douloureuse de la dent (figure n°20). On peut distinguer des abcès gingivaux (atteinte de la gencive marginale et/ou des papilles interdentaires); abcès péri-coronaires situés sur une dent en cours d'éruption et abcès parodontaux provoquent des lésions du ligament dentaire et de l'os alvéolaire (Duyninh et *al.*, 2005).



Figure n°13: Parodontite chronique (Arveux, 2016)



Figure n°14: Parodontite à progression rapide (Lindhe, 2003)



Figure n°15: Parodontite agressive généralisée (Duyninh, 2005)



Figure n°16: gingivites nécrotique (Lindhe, 2003)



Figure n°17: parodontite nécrotique (Lindhe, 2003)



Figure n°18: Parodontite nécrotique (Lindhe, 2003)



Figure n°19: Parodontite chronique chez un diabetique non equilibre (Arveux, 2016)



Figure n°20: Abscès parodontal (Lindhe et *al.*, 2003)

III.3. Traitement des maladies parodontales

Les traitements indiqués en parodontopathies sont pour prévenir, contrôler la maladie, éliminer les niches écologiques de la plaque et de réparer et/ou régénérer les tissus parodontaux lésés (INSERM, 1999; ANAES, 2002).

On peut distinguer les traitements non chirurgicaux (détartrage supra-gingival et détartrage-surfaçage), sont capables de réduire la profondeur des poches mais leur effet sur le niveau d'attache n'était pas clairement visible, les traitements par la chirurgie gingivo-osseuse, sont indiqués pour l'élimination des poches et la formation d'une nouvelle attache et des traitements médicamenteux par les antibiotiques et les antiseptiques peuvent être indiqués dans ce type de pathologies buccodentaires (ANAES, 2002).

La nature infectieuse de la plupart des maladies parodontales et parfois les résultats limités obtenus par la thérapie mécanique conventionnelles ont justifié l'utilisation d'antibiotiques dans certains cas. Cependant, l'antibiothérapie systémique est associée à certains risques, notamment le développement d'une résistance aux antibiotiques chez diverses espèces bactériennes (Grenier et *al.*, 2007).

Selon Lamendin et *al.*, (2004) plusieurs médicaments et produits d'hygiène buccodentaires contiennent des extraits naturels. Mangal et *al.*, (2012) trouvent que la médecine alternative peut être préférée en traitement parodontal pour soulager la douleur, la mauvaise haleine, l'inflammation gingivale, les ulcères de la bouche et les plaies dans la bouche et Shetty et *al.*, (2013) ont confirmé que certains des produits naturels ou à base de plantes et leurs extraits lorsqu'ils sont utilisés dans des bains de bouche ont montré des avantages par rapport aux produits chimiques.



Chapitre IV

Nigella sativa L.



Le mot nigelle vient du mot latin « nigellus », signifiant noir du fait de la couleur de ses graines (Beloued, 1998). Chez les anciens, la Nigelle s'appelait « Mélanthion » (Fournier, 1977). Elle est connue également sous le nom de cumin noir, black seed en anglais, Habbat el baraka ou encore El habbah sauda dans les pays arabes et Sanouj en Algérie (Ghedira, 2006).

IV.1. Historique

Dans la médecine traditionnelle pratiquée en Orient et en Asie, la nigelle est connue depuis longtemps, l'huile de nigelle était déjà connue en Egypte comme un remède très précieux et lors de l'ouverture du tombeau du Pharaon Toutankhamon, des archéologues trouvèrent une fiole d'huile de nigelle (Abdesselam, 2015; Iserin et *al.*, 1997).

Au premier siècle après J-C, le médecin grec Dioscoride a utilisé la Nigelle pour soulager les maux de tête et des dents, au dixième siècle, Ibn Sina a mentionné dans son livre « la guérison de l'âme » que la Nigelle soit un remède naturel à cause de ses larges propriétés d'action (Abdesselam, 2015; Linditsch, 2002) et depuis 14 siècles, notre prophète *MOHAMED* a conseillé d'utiliser les graines de cette plante comme un remède universel (Jauzein, 1995).

IV.2. Le genre *Nigella*

La *Nigella* est une plante herbacée, annuelle, de la famille des *Ranunculaceae* à tige ordinairement rameuse, ses feuilles sont divisées en lanières étroites et linéaires. Les fleurs sont actinomorphes et bisexuées donnant un fruit sous forme d'un follicule ou d'une capsule, sessile et fréquemment renflé. Les graines sont noires ou noirâtres, à trois angles et sont disposées sur deux rangées dans le fruit (Orsi-Llinares, 2005).

Il existe une trentaine quatre espèces répertoriées à ce jour (Abdesselam, 2015), ces espèces réparties en Europe, en Asie occidentale et en Afrique du Nord (Toparslan, 2012; Orsi-Llinares, 2005) dont les plus connus : *Nigella arvensis*, *Nigella damascena*, *Nigella gallica*, *Nigella hispanica*, *Nigella orientalis*, *Nigella oxypetala*, *Nigella latisecta*, *Nigella segetalis*, *Nigella elata*, *Nigella nigellastrum*, *Nigella unguicularis*, *Nigella lancifolia* et *Nigella sativa* (Orsi – Llinares, 2005; El- Dadjaoui, 1996; Fournier, 1977; Kökdil et Yılmaz,

2005). Cette plante aromatique est cultivée pour ses fleurs, ses fruits décoratifs, ainsi que pour ses graines.

IV.2.1. La structure de la graine de *Nigella*

Selon EL- Madani (1999), la graine de *Nigella* est divisée en trois parties. Le péricarpe qui constitue la partie extérieure de couleur noire; l'albumen est blanc, composé de grandes cellules, forme la partie interne, les deux sont séparés par une partie grise, le testa, présente deux ou trois rangées de cellules plus ou moins à paroi épaisse. Il est bleuâtre, noirâtre, ou foncé. L'embryon est situé près de l'apex (Flückiger, 2002).

IV.2.2. *Nigella sativa* L.

Cette espèce est connue sous les noms vernaculaires, cumin noir, la poivrette et la nigelle cultivée, elle est originaire de la Méditerranée et de l'Asie (Iserin et *al.*, 1997; Fournier, 1977). Elle est principalement cultivée, aujourd'hui, dans plusieurs régions du monde (En Afrique du Nord, en Turquie, ainsi qu'en Syrie, en Arabie Saoudite, en Iran, en Pakistan et en Inde) et elle est rare en Europe (Abdesselam, 2015).

IV.2.2.1. Aspect botanique de *Nigella sativa* L.

Nigella sativa L. est une plante annuelle herbacée atteignant 30 à 60 cm de haut. Les feuilles pennatiséquées, divisées en lobes étroits, elles sont lancéolées à linéaires et présentent des onglets nectarifères, les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes et les supérieures sont longues (Bonnier, 1990 ; Ghedira, 2006). Les fleurs sont petites à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes, elles présentent 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, ses graines sont ovoïdes de 2 à 3.5 mm présentent 3 à 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée (Figure n°21) (Ghedira, 2006).

IV.2.2.2. Le semis et la récolte

Nigella sativa L. est très peu exigeante et pousse facilement dans tous les sols bien drainés et dans des endroits chauds et peu humides. Généralement, les graines sont semées directement en place au printemps, en lignes espacées de 30 cm. La germination commence dans 10 à 15 jours. La floraison apparaît après environ six mois de croissance végétative et les graines continuent leur maturation pendant un mois encore et la récolte s'effectue à l'automne après le jaunissement des feuilles et le brunissement des follicules (Toparslan, 2012; Orsi-Llinares, 2005).

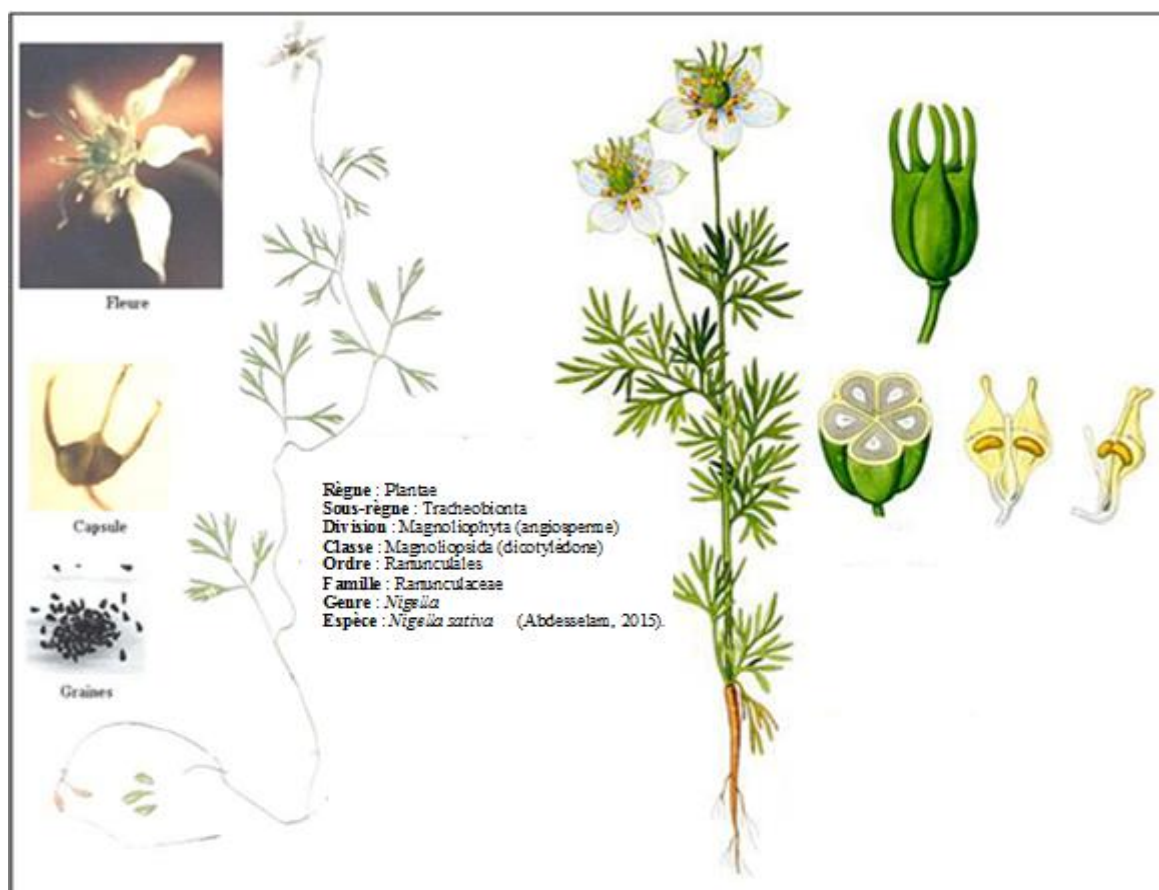


Figure n°21: Aspect morphologique de la plante *Nigella sativa* L.
(Abdesselam, 2015; Toparslan, 2012)

IV.2.2.3. Composition chimique des graines de *Nigella sativa* L.

Le premier rapporteur de la composition des graines de *Nigella sativa* L. était Greenish (1880) qui a déclaré la présence de 37% d'huiles et 4,1% d'éléments minéraux (Toparslan, 2012). Par la suite, plusieurs études ont révélés que ces graines sont très riches en métabolites primaires, dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques,

ainsi que les méthodes d'études (extraction et détection). La composition générale des graines de *Nigella sativa* montre une teneur relativement importante en glucides, lipides (>30%) et en protéines (environs 20%) (tableau n°5).

IV.2.2.3.1. Minéraux

L'analyse minérale des graines *Nigella sativa* L. par spectrophotométrie d'absorption atomique, d'émission atomique et d'absorption moléculaire montraient peu de variations (tableau n°6) avec une teneur intéressante en calcium, potassium, phosphore et une absence totale de métaux lourds (cadmium, plomb et arsenic) (Saleh Al-Jassir, 1992) alors que des traces en nickel et selenium ont été détectés (Uras et al.,2010).

Tableau n°5: Composition générale de la graine de *Nigella sativa* L.(%) (Synthèse)

| | Mohammed et al. (2016) | Khoddami et al. (2011) | Cheikh-Rouhou et al. (2007) | Atta (2003) | Takruri et Dameh (1998) | Nergiz et Otles (1993) |
|---------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------|-------------------------|------------------------|
| Eau | 6.67 | 5.40 | - | 7.0 | 3.83 | 6.4 |
| Cendres | 6.82 | 6.72 | 4.41 | 3.7 | 4.52 | 4.0 |
| Glucides | 35.04 | 30.53 | 32.7 | 33.7 | - | 37.4 |
| Protéines | 19.19 | 20.02 | 22.6 | 20.8 | 21.62 | 20.2 |
| Lipides | 32.26 | 37.33 | 40.35 | 24- 34 | 40.6 | 32.0 |
| Fibres alimentaires | - | - | - | - | 8.4 | 6.6 |

Tableau n°6: Composition minérale de la graine de *Nigella sativa* L. (mg/100g) (Synthèse)

| | Uras et al.(2010) | Takruri et Dameh (1998) | Nergiz et Otles (1993) |
|----------------|-------------------|-------------------------|------------------------|
| Calcium (Ca) | 421.4 | 185.9 | 188 |
| Potassium (K) | 421.8 | 525.7 | 1 180 |
| Sodium (Na) | 36.740 | 49.6 | 85.3 |
| Phosphore (P) | 528.4 | 526.5 | - |
| Zinc (Zn) | 7.879 | 6.04 | - |
| Fer (Fe) | 7.737 | 10.5 | 57.5 |
| Cuivre (Cu) | 0.850 | 1.84 | - |
| Magnesium (Mg) | 138.7 | - | - |
| Chromium (Cr) | 0.575 | - | - |
| Manganese (Mn) | 2.583 | - | - |
| Nickel (Ni) | 0.397 | - | - |
| Selenium (Se) | 0.172 | - | - |

IV.2.2.3.2. Les protéines

Les graines de *Nigella sativa* L. sont très riches en protéines (tableau n°5) dont la protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse des réactions de transestérification (Tuter et al., 2003). L'analyse des acides aminés de l'hydrolysat des protéines de la graine révèle la présence de 17 acides aminés y compris les 8 acides aminés

essentiels (histidine, methionine, lysine, leucine, isoleucine, valine, phénylalanine, thréonine) constituent 30.19% des protéines totales (Saleh AI-Jassir,1992) avec dominance de l'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18%) (Al-Gaby, 1998).

IV.2.2.3.3. Les lipides

Nigella sativa L. a des graines qui renferment plus de 30% des huiles fixes (tableau n°5). Les triacylglycérols (TAG) représentent la fraction la plus importante des lipides par 57,5% (méthode par pression à froid) et 63,2% (méthode d'extraction par solvant) et la teneur en acides gras libres de l'ordre de 14,2% et 8,3% successivement (Atta, 2003). La composition en acides gras a été mise en évidence par plusieurs travaux (tableau n°7), dont douze acides gras ont été détectés, l'acides linoléique et oléique étaient les prédominant (acides gras insaturés) par apport aux acides gras saturée (Khoddami et al., 2011; Atta, 2003; Nergiz et Otlis, 1993; Saleh AI-Jassir, 1992).

Tableau n°7: Les acides gras de la graine de *Nigella sativa* L. (%)(Synthèse)

| | Argon et Gokyer (2016) | Khoddami et al. (1011) | Uras et al., (2010) | Saleh AI- Jassir (1992) |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| | Turkey | Iran | Turkey | Arabe Saudi |
| A. Linoléique (C18:2) | 56.17 | 56.71 | 51.8 | 59.34 |
| A. Oléique (C18:1) | 24.64 | 21.55 | 20 | 23.58 |
| A. Palmitique (C16:0) | 11.94 | 14.11 | 14.1 | 11.9 |
| A. Stéarique (C18:0) | 3.34 | 3.00 | 2.6 | 2.28 |
| A. Eicosadiénoïque (C20:2) | 2.55 | - | 3.3 | ND |
| A. Linoléinique (C18:3) | 0.25 | 2.52 | 0.15 | 0.3 |
| A. Arachidique (C20:0) | 0.2 | - | 0.8 | 0.14 |
| A. Myristique (C14:0) | 0.15 | 1.02 | 0.2 | 0.9 |
| A. Myristoleique (C14:1) | - | ND | - | 0.18 |
| A. Palmitoleique (C16:1) | 0.19 | ND | - | 0.3 |
| A. Lignocerique (C24:0) | - | - | 0.7 | 1.08 |
| A. Caprique (C10:0) | - | 1.12 | - | - |
| A. Eicosénoïque (C20:1) | 0.31 | - | 0.4 | - |
| A. Béhénique (C22:0) | 0.039 | - | 2.1 | - |
| A. Eicosatriénoïque (C20:3n3) | - | - | 0.05 | - |
| A. Docosadiénoïque (C22:2) | - | - | 0.5 | - |
| A. Docosénoïque (C22:1) | 0.047 | - | - | - |
| A. Margarique (C17:0) | 0.061 | - | - | - |
| A. Heptadésénoïque (C17:1) | 0.054 | - | - | - |

A : acide ; ND : non détecté ; - : non réalisé

IV.2.2.3.4. Les métabolites secondaires

Chez les végétaux, il existe des produits dits secondaires, ils ne représentent qu'une très faible partie du poids sec de la graine, mais sont diversifiés sur le plan chimique (Gorenflot, 1994). Plusieurs études ont révélé que ces graines sont très riches en constituants tant de métabolites secondaires que de primaires, dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'études (extraction et détection).

VI.2.2.3.4.1. Polyphénols et flavonoïdes

a) Les Polyphénols

L'étude de Farag et *al.* (2014), a révélée la présence des acides phénoliques (Gentic acid dipentoside, Benzyl alcohol dihexoside, Benzyl alcohol-O-pentosyl-hexoside) et des phénols (Thymoquinol diglucoside, Thymoquinol glucoside, Thymol-O-sophoroside) en extrait méthanolique de la graine *N. sativa* L. et en 2017, Topcagic et ses collaborateurs ont identifié sept composés phénoliques majeurs dans différents extraits de la graine *Nigella sativa* L. (figure n°22).

b) Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de composés polyphénoliques (colorés en jaune) largement répandue dans le règne végétal (Pessel, 2013). Selon Toparslan (2012), les Renonculacées sont riche en flavonols et en flavones. En 2014, Farag et ses collaborateurs ont détecté et identifié, par UPLC-SM, sept flavonoïdes dans l'extrait méthanolique des graines de *Nigella sativa* L. :

- 1) Quercetin-O- α -rhamnosyl-triglucoside
- 2) Quercetin-O-pentosyl- α -rhamnosyl-diglucoside
- 3) Kaempferol-3-O-sophorotrioside-7-O-rhamnoside
- 4) Kaempferol-O-pentosyl-glucoopyranoside
- 5) Kaempferol-3-O-[[β -D-glucoopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranosyl-(1-2)- β -Dglucoopyranoside]
- 6) Kaempferol-O- α -rhamnosyldiglucopyranoside

- 7) Quercetin-O- α -rhamnosyl-diglucopyranoside
- 8) Kaempferol-O- α -rhamnosyl-glucopyranoside
- 9) Kaempferol

Pour obtenir des données plus précises sur les flavonoïdes glycosides et aglycones, l'extrait éthanolique de la graine *Nigella sativa* L. a été analysé par HPLC-UV-SM avant et après l'hydrolyse acide (HCl et acide ascorbique). Les résultats obtenus montrent des proportions variable en acide férulique, quercitrine, la quercétine, Kaempferol et l'acide paracoumarique (Toma et al., 2015).

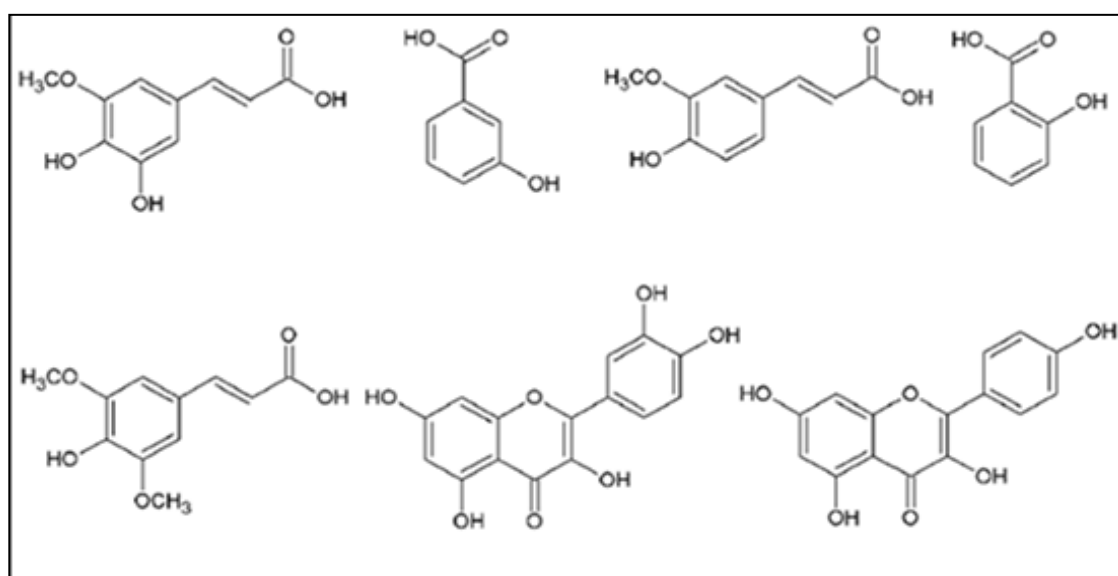


Figure n°22: Structure des composés phénoliques des extraits de la graine de *Nigella sativa* L. (Topcagic et al., 2017)

IV.2.2.3.4.2. Les terpènes et saponines

a) Les terpènes

Sont souvent les constituants odoriférants et dont on sait depuis très longtemps les extraire sous la forme des huiles essentielles (Arnaud, 1978). Selon leur structure, on distingue deux groupes des substances terpéniques : Les hydrocarbures terpéniques et les composés terpéniques oxygénés. Les hydrocarbures terpéniques ont les formules brutes : $C_{10}H_{16}$ (monoterpènes), $C_{15}H_{24}$ (sesquiterpènes), $C_{20}H_{32}$ (diterpènes), $C_{30}H_{48}$ (triterpènes) ou $C_{40}H_{64}$ (tétraterpènes). Certains ont une structure aliphatique et comportent le nombre de

doubles liaisons correspondantes à leur formule brute, d'autres comportent un ou plusieurs cycles et un nombre plus réduit des doubles liaisons (Arnaud, 1978).

Les terpènes et précisément les triterpènes pentocycliques ont des propriétés *antimicrobiennes*. Ils se substituent aux stéroïdes membranaires et amènent la destruction des membranes (Guignard, 2000). Les composés terpéniques oxygénés ont des chaînes carbonées analogues à celles des hydrocarbures, aliphatiques ou cycliques, mais ils sont parfois moins insaturés que les hydrocarbures correspondants (Arnaud, 1978).

La richesse de *Nigella sativa* L. en terpène est rapportée par Toparslan (2012) (tableau n°8) et en étude précédente, sept échantillons des huiles essentielles ont été obtenus par la technique de Soxhlet et l'entraînement à la vapeur, 32 composés ont été identifiés par GC-MS. La fraction principale de chaque huile volatile examinée consistait en un mélange de monoterpènes (figure n°23) dont les principaux composés étaient la thymoquinone (30% à 48%), p-cymène (7% à 15%), carvacrol (6% à 12%), 4-terpinéol (2% à 7%), t-anéthole (1% à 4%) et le sesquiterpène longifolène (1% à 8%) (Burits et Bucar, 2000).

Une autre étude de Benkaci–Ali et ses collaborateurs (2007) montre que les huiles essentielles de la graine *Nigella sativa* L. cultivée à Adrar et Timimoune (Sahara Algérienne) obtenus par micro onde (MD) pourraient être différenciées des huiles obtenues par l'hydrodistillation (HD) par leur plus grande richesse en hydrocarbures monoterpènes avec des teneurs variant entre 42-46% alors que la teneur hydrocarbures sesquiterpéniques est de l'ordre de 8.9 et 5.8% successivement. Ces résultats ont été confirmés également par Shaba et al.(2015), dont la thymoquinone était le constituant principal de l'HE (52,6%) suivie par p-cymène (25,8%).

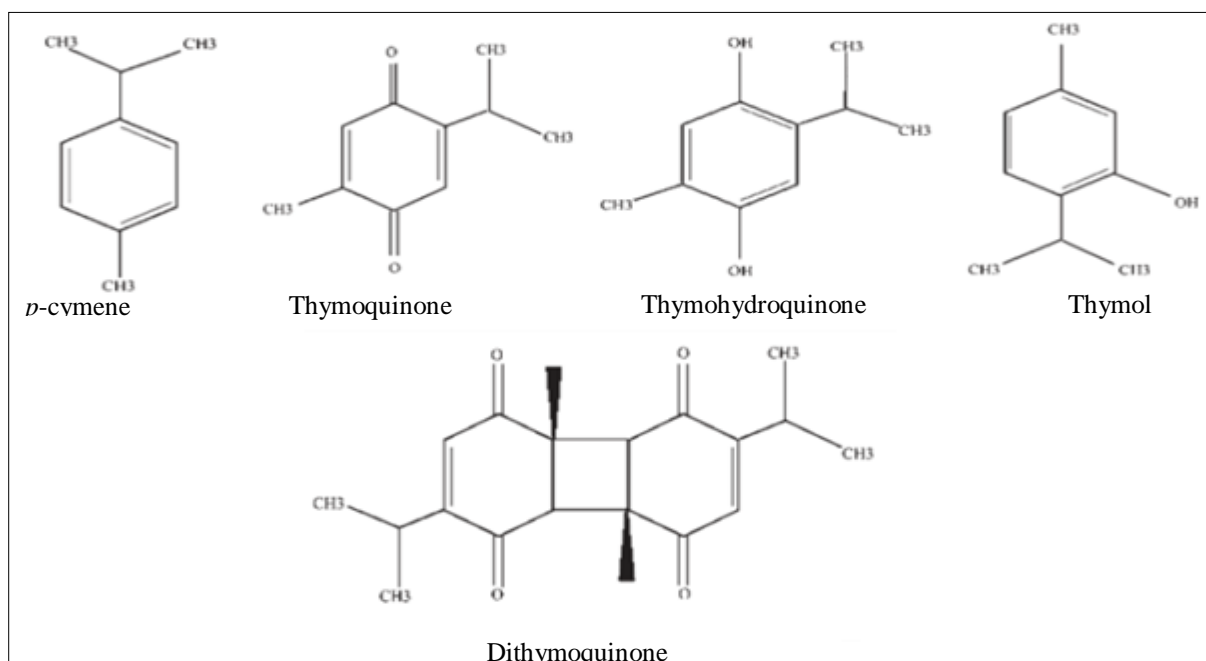


Figure n°23: Composés terpéniques de *Nigella sativa* L. (Amin et Hosseinzadeh, 2015)

Tableau n°8: Principaux composés terpéniques isolés de *Nigella sativa* L.
(Toparslan, 2012)

| Composé | Nature | Partie de la plante |
|----------------|-------------|---------------------|
| Butyrospermol | Triterpène | Huile de graine |
| Carvacrol | Monoterpène | Huile de graine |
| Carvone | Monoterpène | Huile essentielle |
| Citrostadienol | Triterpène | Huile de graine |
| Cycloartanol | Triterpène | Huile de graine |
| Cycloarténol | Triterpène | Huile de graine |
| Cycloeucalénol | Triterpène | Huile de graine |
| Dithymoquinone | Monoterpène | Huile de graine |
| Hederagénine | Triterpène | Graine |
| Saponine | Triterpènes | Graine |
| Taraxérol | Triterpène | Huile de graine |
| Thymol | Monoterpène | Huile de graine |
| Thymoquinone | Monoterpène | Huile de graine |
| Tirucallol | Triterpène | Huile de graine |

b) Les saponines

Les saponines constituent 0.013% du poids sec de la graine *Nigella sativa* L. (Rathee et al., 1982), sont des hétérosides résultant d'une liaison de génine avec un ose (génine-ose).

Ces derniers ne sont pas hydrolysables ni par des acides, ni par voie enzymatique. Seule une oxydation permet leur séparation (Guignard et *al.*, 1983).

Dans une étude réalisée par Kumara et Huat (2001), il a été possible d'isoler et de caractériser à partir des graines *Nigella sativa* L. une saponoside triterpénique douée de propriétés antitumorales appelée l' α -hederine (figure n°24). Elle est accumulée dans les téguments et dans les tissus intérieurs par différentes proportions (Abdesselam, 2015). Une étude ultérieure de Taskin et *al.* (2005) a permis d'isoler à partir de l'extrait méthanolique trois autres saponosides apparentées à l' α -hederine (figure n°25).

Selon Multon (1991), le goût amer des saponines constitue un moyen de défense chimique des plantes, elle provoque la précipitation des stérols ou de se combiner à ceux des membranes, détériorer le fonctionnement des membranes et arrêter la croissance des mycéliums.

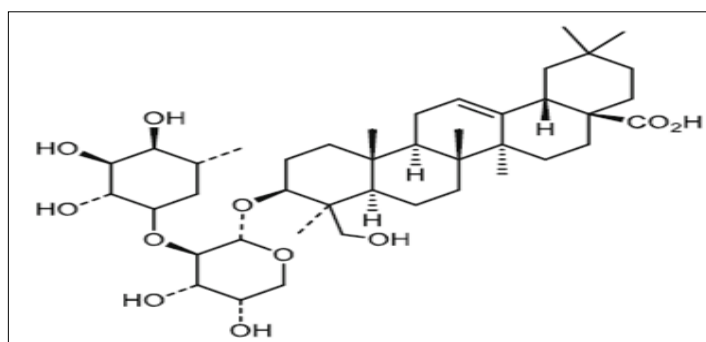


Figure n°24 : Structure chimique de l' α -hederine (Akram Khan et Afzal, 2016)

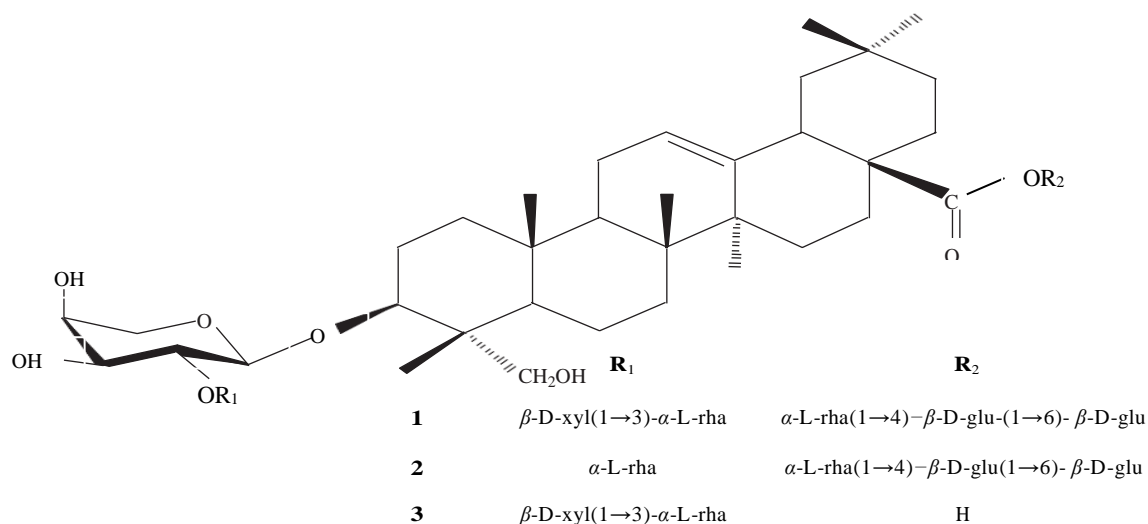


Figure n°25: Saponines de la graine de *Nigella sativa* L. (Taskin et *al.*, 2005)

IV.2.2.3.4.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances présentant un caractère alcalin, contenant de l'azote, le plus souvent inclus dans un hétérocycle (Toparslan, 2012). Plusieurs travaux ont identifié des alcaloïdes terpéniques à base de l'isoquinoléine et l'indazole dans les graines de *Nigella sativa* L. (Akram Khan et Afzal, 2016; Abdesselam, 2015).

Les alcaloïdes de l'isoquinoléine comprennent la nigellicimine et nigellicimine-N-oxyde et les alcaloïdes indazolés comprennent la nigellidine et la nigellicine (Figure n° 26). Des alcaloïdes diterpéniques type-dolabellane sont mis en évidence sous le nom de nigellamines A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, ont été isolés de l'extrait méthanolique des graines *N. sativa* L. (Akram Khan et Afzal, 2016). D'autres auteurs ont rapporté également l'extraction des nigellamines B₁, B₂, C des graines *Nigella sativa* L. (Karrandou, 2016; Orsi-Llinares, 2005).

Les systèmes cycliques indazole ont, pour la plupart, des actions physiologiques et thérapeutiques à faibles doses (Toparslan, 2012), ils sont intégrés à de nombreux produits pharmaceutiques ce qui attiré l'attention de chimistes organiques tel que Akram Khan et ses collaborateurs (2016) pour leurs synthèses totales.

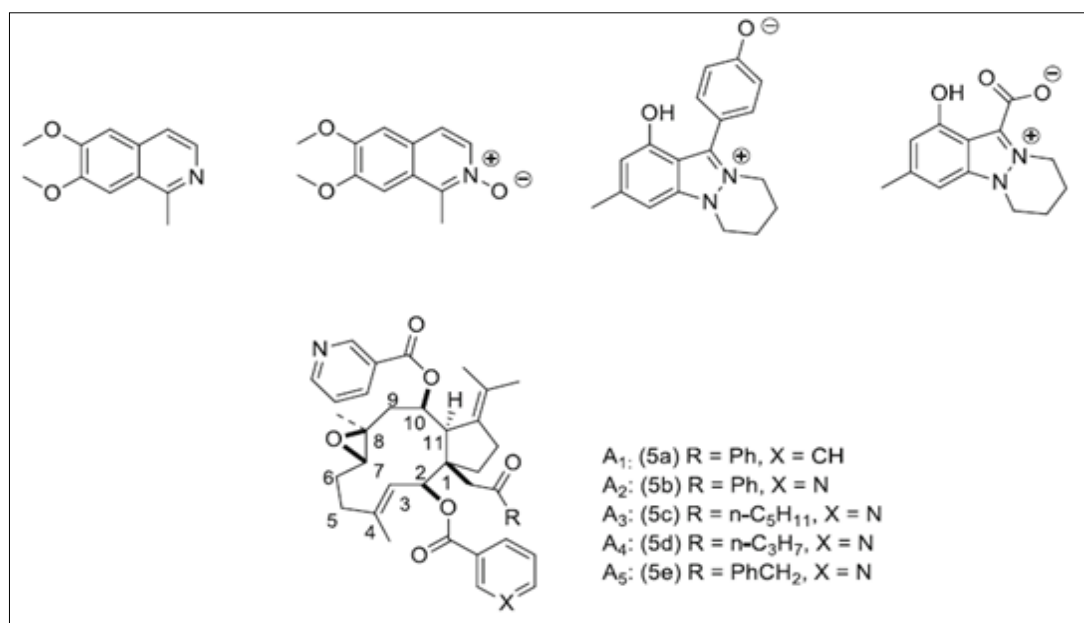


Figure n°26: Structure des alcaloïdes de *Nigella sativa* L. (Uras, 2009)

VI.2.2.3.4.4. Les vitamines

Les résultats d'analyses par HPLC ont révélé la richesse des graines *Nigella sativa* L. en thiamine B1 (831µg/100g), riboflavine B2(63µg/100g), pyridoxine B6 (789µg/100g), niacine PP(6311µg/100g)) et de l'acide folique (42µg/100g) (Nergiz et Otles, 1993), alors qu'une autre étude de Ramadan et Mörsel (2002) a montré la présence de la vitamine A (0.05%) et la vitamine K (0.1%) (citer dans Karrandou, 2016) tandis que Uras et ses collaborateurs (2010) ont rapporté des quantités similaires de tocophérols γ et δ (14.86 et 14.60mg/100g respectivement) en huile fixe de graines *Nigella sativa* L. et la quantité de l'acétate d' α -tocophérol et d' α -tocophérol étaient de l'ordre 2.11mg/100g, et 1.70mg/100g successivement.



PARTIE II

Etude expérimentale





Matériel et Méthodes



I.1. Objectifs

Le travail de cette thèse a été effectué au laboratoire de Bioconversion Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (LBGMS) sur une période allant de 2011 à 2019.

Dans le cadre de mise en valeur des plantes médicinales locales (à usage traditionnel) et en contribution de valoriser leurs utilisations à l'échelle de l'industrie pharmaceutique, dans cette étude, nous avons travaillé sur la formulation des émulsions aux extraits naturels de la graine Algérienne *Nigella sativa* L. pour des usages buccaux .Après la préparation des extraits, le dosage quantitative des principes actifs et la caractérisation des extraits par la CCM, CPG-SM, UPLC-SM et IRTF, nous avons étudiés l'activité biologique *in vitro* de l'huile essentielle et de l'extrait brut méthanolique sur des souches microbiennes isolées de la cavité buccale de personnes souffrantes des maladies parodontales (parodontites et gingivites).

En deuxième partie nous avons formulé et étudier la stabilité des émulsions pharmaceutiques par l'évaluation de la qualité physicochimique, microbiologique, macroscopique et microscopique durant 60 jours de conservation à différentes températures (4°C, 20°C, 40°C).

En troisième partie une application thérapeutique a été effectuée sur des patients souffrants des gingivites dont l'activité antimicrobienne (*in vivo*) de l'émulsion à base d'extrait naturel de *N. sativa* sur la plaque dentaire et son impact sur l'indice de gingivite (IG), indice d'hygiène orale (IHO) et l'indice de plaque (IPI) a été évaluée.

I.2. Matériel végétal

Pour réaliser ces objectifs, notre choix de matériel végétale s'est porté sur une espèce disponible, consommable et cultivable en Algérie qui sont les graines de *N. sativa* (figure n°27). Elles sont récoltés à la fin du mois d'Avril et début de Mai (2012, 2013, 2014) dans la région de Qsar Admor, Konta (Adrar-Algérie), située à environ 1 400 km au Sud-ouest d'Alger.

L'identification botanique de l'espèce a été confirmée par des enseignants botanistes au département de Biologie, faculté S.N.V. de l'université Mustapha Stambouli de Mascara.

Une autre confirmation de l'espèce végétale a été réalisée par la vérification des propriétés morphologiques des feuilles, fleurs, tiges et les capsules par le semis volontaire de ces graines (le mois d'Octobre 2018) dans un champ agricole à Mascara (Algérie) (figure n°28).

Les capsules de la graine de *N. sativa* de Qsar Admor ont été conservées dans des sacs en papier propres à température ambiante, à l'abri de la lumière et d'humidité pour une utilisation ultérieure.



Figure n°27: Plante et graines de *Nigella sativa* (Qsar Admor, Konta, Adrar- Algérie)



Figure n°28: Plante de *Nigella sativa* (Graines d'origine de Qsar Admor et plantées à Mascara)

I.3. Patients**I.3.1. Les Patients des tests *in vitro***

Les souches microbiennes ont été isolées à partir des cavités buccales de 12 patients (4 hommes, 8 femmes) âgés de 16 à 75 ans souffrants des maladies parodontales. Avant chaque prélèvement, le malade subit un diagnostic médical réalisé par des chirurgiens dentistes « Hôpital Mehr Mohiuddin » à Mascara, Algérie et un questionnaire (annexe II).

I.3.2. Les patients des tests *in vivo*

30 patients (hommes) souffrants des gingivites ont été sélectionnés par des chirurgiens dentistes et répartis en deux groupes; groupe I formé par 15 patients (âgés entre 27-35) qui ont utilisé un rince-bouche à base d'huile essentielle de *N. sativa* (émulsion à l'HE) et le groupe II des témoins comporte 15 patients (âgés entre 23-30) ont reçu une eau distillée (ED) stérile (test placebo).

Pendant la période du traitement nos patients n'ont utilisés aucun des types des dentifrices ou des médicaments (antibiotique, anti-inflammatoire.....).

I.4. Méthodes**I.4.1. L'extrait sec total (E.S.T.)**

L'E.S.T. ou la matière sèche est exprimé par la masse restante après une dessiccation complète du produit (à $103\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 01h30), indiquée en fonction massique et exprimée en pourcentage (%) par apport au poids frais (La méthode gravimétrique).

$$\text{E.S.T. \%} = [(m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)] * 100$$

m_0 : masse de la capsule vide (g).

m_1 : masse de la capsule et la prise d'essai avant le séchage (g).

m_2 : masse de la capsule et la prise d'essai après le séchage (g).

I.4.2. Taux de cendre

Le taux de cendre est la quantité de substance résiduelle non volatile obtenue après une calcination complète des épices et d'aromates à $550 \pm 25^\circ\text{C}$ ou $600 \pm 25^\circ\text{C}$ (Richard, 1992). Le taux de cendre est exprimé en % et calculé par la formule suivante:

$$\text{TC \%} = [(m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)] * 100$$

m_0 : masse de la capsule vide (g).

m_1 : masse de la capsule et la prise d'essai avant la combustion (g).

m_2 : masse de la capsule avec cendre (g).

I.4.3. Préparation des extraits de la graine *Nigella sativa*

I.4.3.1. L'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle est effectuée par l'entraînement à la vapeur (*ex situ*) (Blanchaud-Desce et al., 1987). 30g de matériel végétal broyé en fine poudre est placé dans un ballon traversé par un courant de vapeur d'eau pendant 01h30mn ce qui fait éclater les cellules. Les principes volatils peu solubles dans l'eau sont alors entraînés par la vapeur d'eau du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe (figure n°29).

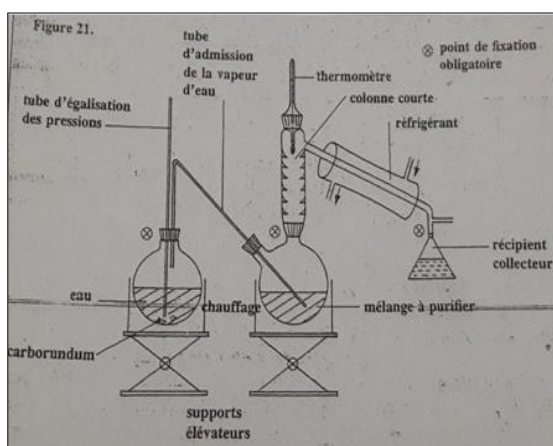


Figure n°29 : Extraction des huiles essentielles par l'entraînement à la vapeur (*ex situ*) (Blanchaud-Desce et al., 1987)

Après le relargage, les huiles essentielles ont été récupérées par l'extraction liquide-liquide en utilisant le n-hexane. Le sulfate de sodium anhydre est ajouté pour éliminer les

traces de l'eau. La phase organique est concentrée par un évaporateur rotatif (à +37°C sous vide) avec un ballon préalablement taré. L'huile essentielle est conservée dans des tubes stériles en verre à +4°C. Le rendement d'extraction est calculé par le rapport entre le poids de l'huile essentielle et le poids de la plante traitée et exprimé en pourcentage.

I.4.3.2. Préparation de l'extrait brut méthanolique

La macération est effectuée selon la méthode décrite par Houcher *et al.* (2007) qu'on a modifié au laboratoire. 50g de broyat de la graine *N. sativa* ont été mis en macération avec 500 ml de méthanol 80% (1/10=w/v) pendant 24 h à température ambiante avec une agitation à l'aide d'une baguette magnétique.

Le macérât obtenu est filtré (sous vide) et concentré par un évaporateur rotatif à +40°C (EM1). Le résidu est re-extrait par le méthanol 50% (1/10=w/v) pendant 24 h, filtré puis concentré à 40°C (EM2).

Les deux extraits constituent l'extrait brut méthanolique de la graine *N. sativa* (EM), sont mélangés et conservés dans un flacon en verre; stérile à +4°C. Le rendement d'extraction est calculé par le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante et exprimé en pourcentage.

I.4.4. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes

I.4.4.1. Dosage des polyphénols totaux

La quantification des polyphénols totaux est faite selon la méthode décrite par Bourgou *et al.* (2008). Le réactif Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lors d'oxydation des phénols, il réduit en mélange d'oxydes de tungstène et de molybdène (Harnafi *et al.*, 2008). La coloration produite (bleu), dont l'absorbance est maximale, est proportionnelle à la concentration des polyphénols présents dans les extraits.

Mode opératoire

Dans un tube à essai, 0,125 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10) est ajouté à 0,5 ml de l'eau distillée et 0,125 ml d'extrait dilué. Après l'incubation de 3 minutes à température ambiante, 1,52 ml de solution Na₂CO₃ (7%) est ajoutée. Finalement, le volume est complété à 3 ml en utilisant de l'eau distillée. La solution est mélangée par vortex et incubée en obscurité pendant 90 minutes à température ambiante.

L'absorbance de la solution est mesurée à 760 nm par rapport au blanc en utilisant un spectrophotomètre (JENWAY 6400). Les concentrations des composés phénoliques totaux dans chaque extrait ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ($y = 0,013x + 0,000$; $R^2 = 0,992$) et exprimées en milligrammes d'équivalents d'acide gallique (EAG) par gramme d'extrait.

I.4.4.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes est effectuée par la méthode adaptée avec Salem et al. (2013a), elle est basée sur la complication des flavonoïdes par l'aluminium en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif.

Mode opératoire

Dans un tube à essai, 4 ml de l'eau distillée est additionnée à 1 ml de l'extrait dilué et 0,3 ml de NaNO₂ (5%). Après cinq minutes, 0,3 ml d'AlCl₃ (10%) est ajouté, le mélange est incubé pendant six minutes à température ambiante. Ensuite, 2 ml de NaOH (4%) est ajouté et le volume total de 10 ml est immédiatement complété avec de l'eau distillée. Après 15 minutes d'incubation en obscurité à température ambiante, le mélange est soigneusement agité et l'absorbance est lue contre le blanc à 510 nm. Une gamme d'étalonnage de catéchine a été préparée dans les mêmes conditions ($y = 0,001x + 0,018$; $R^2 = 0,996$) et les teneurs en flavonoïdes ont été exprimées en milligrammes d'équivalent catéchine (EC) par gramme d'extrait.

I.4.5. Analyse des extraits de la graine *N. sativa* par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est une méthode analytique de séparation et d'identification rapide des constituants d'un extrait donné. Dans ce travail, la phase stationnaire était en gel de silice étalé sur des plaques en aluminium et onze (11) systèmes de solvants (certains sont référenciés et d'autres sont modifiés) ont été proposés pour séparer les différents composants éventuellement présents dans nos extraits (tableau n°9). La révélation des plaques est effectuée à l'UV (366 nm). L'interprétation qualitative des résultats était basée sur la comparaison des Rf des spots apparus sur les plaques CCM avec ceux des témoins (l'acide gallique, catéchine, quercétine, acide éllagique et vanilline).

Tableau n°9: Les phases mobiles de CCM

| Extraits | Phases mobiles |
|---|---|
| HE | Toluene-methanol (1.9:0.1v/v); Ether diéthylique- n-hexane (1:1v/v) ; Acétate d'éthyle-acétone-acide formique-eau (5:3:1:1v/v/v/v) |
| EM | Hexane -methanol- eau distillé -acétone (1:1:1:1 v/v/v/v) ; Toluene-acetate d'Ethyl- acide formique (5:4:1 v/v/v) ; Acétate d'éthyle- methanol-eau distillée (7.7:1.3:1 v/v/v)(Radomir et <i>al.</i> , 2010) |
| HE, EM | Hexane-acetone-Ether diéthylique-methanol- eau distillée (1:1:1:1:1 v/v/v/v/v) ; Hexane - Ether diéthylique- acetone (4:1:0.15 v/v/v) (Salami et <i>al.</i> ,2007 modifié) ; Acetone-hexane (1:2 v/v) ; Hexane - Ether diéthylique - methanol (4:1:0.15 v/v/v) (Salami et <i>al.</i> ,2007) ; Chloroforme-Acétate d'éthyle - acide formique (5:4 :1 v/v/v) (Goren et <i>al.</i> ,1974; Riov et Gottlieb,2006) |
| HE : Huile essentielle ; EM : Extrait méthanolique, v : volume | |

I.4.6. Analyse des l'huiles essentielles de la graine *N. sativa* par la chromatographie en phase gazeuse couplé à spectrométrie de masse (CPG-SM)

L'analyse est réalisée au niveau de centre de recherche scientifique et techniques en analyses physico-chimique-Expertise-Tipaza, Algérie (SPA CRAPC Expertise SPA).La composition de l'huile essentielle est déterminée par CPG -SM (Hewlett-Packard Agilent) comprenant un chromatographe en phase gazeuse 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973 en utilisant une colonne capillaire de type HP-5MS (Hewlett-Packard, 30 m ;D int 0,25

mm ; épaisseur de film 0,25 μm); la phase stationnaire est formée de 5% phenyl et 95% dimethylpolysiloxane. L'échantillon (0.2 μl) est injecté à 250°C par le mode split 20:1 ; le gaz vecteur est l'Helium (débit de 0,5 ml / min); température du four, 60°C pendant 8 min, s'élevant 2°C /min jusqu'à 250°C, la durée d'analyse est 113min .Le détecteur de masse est de mode Scan TIC avec un impact électronique à 70 eV (annexe I).L'indice de rétention et le pourcentages de chaque constituant volatil est calculé en utilisant une série homologue d'un mélange de n-alcane.

I.4.7. Analyse de l'extrait méthanolique de la graine *N. sativa* par la chromatographie liquide Ultra Performante couplée à spectrométrie de masse (UPLC-SM)

L'UPLC est une nouvelle technique analytique permet d'améliorer la résolution chromatographique, la vitesse d'acquisition, la sensibilité d'HPLC et la réduction de la consommation des solvants. Elle est basée sur l'utilisation des colonnes avec des particules de faible diamètre (1.7 μm) et des pressions très élevées (Naresh et *al.*, 2014; Sheliya et Shah 2013).

L'identification des composés dans l'extrait méthanolique de la graine *N.sativa* est effectuée sur un système UPLC- couplé à un détecteur de longueurs d'onde UV-Vis au niveau de Fondation Marocaine de Recherche Avancée et d'Innovation (MASCIR-Maroc). L'analyse est réalisée à l'aide du système Waters Acquity UPLC (de Waters, Corp.), composé d'un système de gestion de solvant binaire, d'un dégazeur en ligne et d'un échantillonneur automatique et une colonne Acquity UPLC BEH RP C18 (2,1 \times 100 mm, 1,7 μm , eau). La détection par spectrométrie de masse est assurée en utilisant un système QTOF MS (Waters Corp.) équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI).Les spectres ESI-MS ont été acquis en mode ion négatif. Un détecteur à matrice de photodiodes (PDA) est placé entre la colonne analytique et le SM.

La phase mobile est un gradient binaire: méthanol et acide acétique à 0,1% (v/v). L'élution est débutée avec un gradient linéaire commençant à 5% de méthanol et se termine à 42% de méthanol pendant 35 min; puis 42% de méthanol pendant les 3 prochaines minutes. Le débit est de 1ml/min et le volume d'injection est 5 μl . Le détecteur UV est programmé à 330 nm et 370 nm (Toma, 2015).

I.4.8. Analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La spectroscopie infrarouge est une méthode analytique appliquée pour déterminer les groupements fonctionnels dans les molécules organiques. L'huile essentielle, l'extrait méthanolique, le broya de la graine de *N. sativa* et les résidus d'extractions ont été caractérisés par la méthode de spectromètre à transformée de Fourier (IRTF) de type Agilent Technologies au niveau de L.M.A.E, université Mustapha Stambouli de Mascara, Algérie. Les spectres de la transmittance en fonction des nombre d'onde entre 4000-400 cm^{-1} ont été enregistrés à température ambiante.

I.4.9. Etude *in vitro* de l'activité biologique des extraits de la graine *N. sativa* sur la flore buccale des malades parodontaux**I.4.9.1. Prélèvement des échantillons**

Après un rinçage de la bouche avec de l'eau distillée stérile, les plaques supragingivales ont été prélevées par des écouvillons stériles humidifiés avec une solution saline physiologique, tandis que des plaques sous-gingivales ont été recueillies par des curettes Gracey stériles insérées dans la poche parodontale. Les échantillons ont été placés dans des tubes stériles et immédiatement transportés au laboratoire (Hoceini, 2017; Yacoubi et al., 2010, Colombier et al., 2006).

I.4.9.2. Recherche, isolement et l'identification des souches microbiennes

Cette partie comporte l'enrichissement des prélèvements, l'isolement, l'identification macroscopique, microscopique et biochimique des microorganismes.

I.4.9.2.1. L'enrichissement des prélèvements

Les prélèvements ont été brassés en 2ml de bouillon nutritif ou bouillon cœur cerveau (BHIB) (régénéré par un chauffage au bain marie à 100°C pendant 10 mn) et incubés à 37°C pendant 24h (annexe III).

I.4.9.2.2. L'isolement des espèces microbiennes

Pour l'isolement de la flore buccale, on a utilisé la méthode d'ensemencement en quatre quadrants sur des milieux sélectifs des bactéries à Gram positif, Gram négatif et des levures et moisissures. Les conditions de culture et d'incubation sont déterminées selon chaque souche isolée.

A) L'isolement des bacilles à Gram négatif

Le milieu E.M.B., V.R.B.G., Gélose Mac Conkey et la gélose Hektoen (annexe III) sont utilisés pour l'isolement des *Enterobacteriaceae* pathogènes (les colorants et les sels biliaires de ces milieux, inhibent la majeure partie de la flore à Gram positif) et la gélose au cetrimide était le milieu de choix pour l'isolement des *Pseudomonas* (annexe III).

Le milieu d'enrichissement (BHIB) est repiqué sur les milieux d'isolement qui ont été examinés après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h. La lecture est faite selon l'aspect des colonies.

B) L'isolement des coques à Gram positif**• *Staphylococcus***

L'isolement est effectué sur milieu hyper salé, gélose Chapman (annexe III), après l'incubation à 37°C pendant 24 à 48h, les colonies des Staphylocoques pigmentées en jaune citron, orange ou blanchâtre (Diaf, 2002) et la fermentation du mannitol; révélée par un virage de l'indicateur coloré à sa teinte acide (virage de rouge au jaune); permet à une orientation vers certaines espèces (Brossard et al., 2006).

• *Streptococcus*

L'isolement des *Streptococcus* hémolytiques est effectué sur gélose Columbia au sang frais alors que la Bile Esculine Azide (BEA) est destinée pour l'isolement sélectif et la différenciation des Streptocoque groupe D pour lesquels la tolérance à la bile et l'hydrolyse de l'esculine sont considérées comme des caractères constants (Brossard et al., 2006). 200µl de milieu d'enrichissement est étalé sur la surface de milieu solide avec une incubation à 37°C pendant 24 à 72 h. Le type d'hémolyse et l'aspect des colonies noires caractéristiques de

Streptocoque groupe D sur la BEA sont enregistrés (complexe esculétine-sel de fer). Un test de tolérance au NaCl (bouillon à 6.5% de NaCl) permet également de distinguer les entérocoques des Streptocoques de groupe D (Brossard et *al.*, 2006; Avril et *al.*, 2000).

C) L'isolement des bacilles à Gram positif

- ***Bacillus***

L'isolement des *Bacillus* est effectué sur gélose nutritive et milieu Mossel à 37°C 24-48h. La confirmation de ce genre est apportée par la mise en évidence du caractère sporogène de ces bacilles (annexe III).

- ***Lactobacillus***

En raison des exigences complexes de ce genre, la croissance de *lactobacillus* n'est possible que sur des milieux spéciaux dont le plus connus est le milieu Man, Rogosa et Sharpe (MRS) (Avril et *al.*, 2000). L'incubation est faite, dans une jarre anaérobie ou dans un dessiccateur en utilisant la méthode à la bougie, à 37°C pendant 24 à 72 h (annexe III).

D) L'isolement des bactéries anaérobies à Gram négatif

L'isolement est effectué sur les milieux gélose Columbia au sang et gélose cœur cervelle au sang à 37°C pendant 72-10-14jours (Augusto Pfau et Avila-Campos, 2005). L'anaérobiose est créée par l'ensemencement d'une goutte de la suspension microbienne en profondeur d'un milieu gélosé préalablement régénéré et refroidies à 45°C et recouvrir à la surface par une couche de l'huile de vaseline stérile (Brossard et Terry, 1991) ou par l'incubation de la gélose ensemencée dans une jarre anaérobie.

E) L'isolement des levures microscopiques

200µl de la suspension microbienne est étalée sur la surface de milieu Sabouraud-chloramphenicol- gentamicin, Sabouraud et Sabouraud-actidione avec une incubation à 25°C pendant 3-5 jours.

I.4.9.2.3. L'identification des souches microbiennes

Suivant aux schémas d'identification dichotomique des principaux groupes bactériens (figures n°30, 31,32) proposés par Leyral et Joffin (1998), les démarches d'identification des caractères phénotypiques des souches isolées est basée principalement sur les critères morphologiques; Caractères cultureux; Caractères biochimiques.

I.4.9.2.3.1. Identification macroscopique et microscopique

L'aspect des colonies (taille, forme, surface, l'opacité, la consistance et la pigmentation) est enregistré, il dépend du milieu de culture utilisé, la durée et de la température d'incubation (Joffin et Leyral, 2006).

L'examen microscopique de bactéries à l'état frais en milieu liquide a permis d'apprécier leur mobilité (ou immobilité) et leur morphologie tandis que la coloration différentielle de Gram a pour but une mise en évidence des propriétés structurales de la paroi bactérienne. Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet et les Gram négatif sont colorés en rose (annexe III).

I.4.9.2.3.2. Tests biochimiques d'orientation**a) Recherche de Catalase**

Le test catalase sert à détecter la présence de cette enzyme dans une souche bactérienne donnée. Il consiste essentiellement à exposer les cellules bactériennes au peroxyde d'hydrogène. La présence de catalase se marque par la formation des bulles de gaz (O₂) (Paul, 1999). Ce test est important pour l'orientation d'identification des bactéries aérobies, à Gram positif. En effet, toutes ces bactéries, leur catalase est positive sauf les genres *Erysipelothrix*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* (Leyral, 1973).

b) Test d'oxydase

Ce test permet de différencier les entérobactéries des autres cocci, coccobacilles et bacilles à Gram négatif (Leyral et Joffin, 1998). La présence de la coloration violette sur les disques d'oxydase révèle un résultat positif.

c) Test de mannitol mobilité

Le milieu mannitol mobilité permet la recherche simultanément de la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries (Brossard et *al.*, 2006; Marchal et *al.*, 1982). La dégradation de mannitol conduit à la formation du fructose dont l'attaque aboutit à la formation des acides à chaînes très courtes (acide acétique, acide formique) qui entraînent le virage du milieu au jaune et les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement. Ce test est très répondu pour l'identification des bacilles à Gram négatif dont les entérobactéries.

d) Recherche de Citrate perméase

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons de couleur verte, qui ne contient que le citrate de sodium comme seule source de carbone. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu. L'utilisation de citrate provoque l'alcalinisation du milieu et le virage de la couleur en bleu (Marchal et *al.*, 1982).

e) Détermination du type respiratoire

Pour déterminer le type respiratoire des bactéries (anaérobie stricte, anaérobie facultative et les aérobies stricte), le milieu viande foie est reparti en tubes étroits, l'ensemencement est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur scellée et chargée en remontant en spirale la gélose. Après la solidification on a incubé à 37 °C 24h (Leyral, 1973).

f) Recherche de Beta galactosidase (test ONPG)

En cas des bactéries possédant l'enzyme β -galactosidase, l'ortho-nitro-phenyl-galactoside (ONPG) s'hydrolyse en un produit coloré (l'orthonitrophenol ONP)

g) Nitrate réductase

Après l'ensemencement du bouillon nitraté par la suspension bactérienne et l'incubation à 37 C°/ 24h, nitrate réductase positive est détectée par le virage au rouge après l'ajout des deux réactifs NRI et NRII.

h) Test de Coagulase

Ce test est utilisé pour distinguer les *Staphylococcus aureus* (coagulase positive) de la plupart des autres espèces de ce genre (coagulase négative). Un résultat positif se manifeste par la coagulation du plasma (formation d'un caillot) résulte de la transformation de fibrinogène en fibrine.

I) Test d'hémolyse sanguine

La culture de certaines souches microbiennes sur Gélose Columbia au sang frais permet la lecture de différents caractères hémolytiques (hémolyse β , hémolyse α , non hémolytique NH) (Brossard et al., 2006).

I.4.9.2.3.3. Identification des Bactéries par le système Api

L'identification bactérienne est complétée par différents systèmes multi-tests miniaturisés des API Staph (Staphylocoque, Microcoque), API 20Strep (Streptocoque, *Enterococcus*), API 20E (*Enterobacteriaceae*), API 20NE (autres bacilles à Gram-négatif non *Enterobacteriaceae*) et API 20A (strictement anaérobie) selon le manuel de BioMérieux.

I.4.9.2.3.4. Identification des levures microscopiques

Un examen microscopique à l'état frais est réalisé entre lame et lamelle des colonies cultivées sur le milieu Sabouraud, Sabouraud-actidione-chloramphénicol et la gélose Sabouraud chloramphénicol-gentamicine. La production de filament dans un tube contenant du sérum humain après une incubation à 37°C pendant 3 heures nous a permis de confirmer la présence de *Candida albicans*. L'observation des tubes germinatifs s'est faite au microscope à l'objectif 40X (Diallo, 2005). L'identification est complétée par les API Candida.

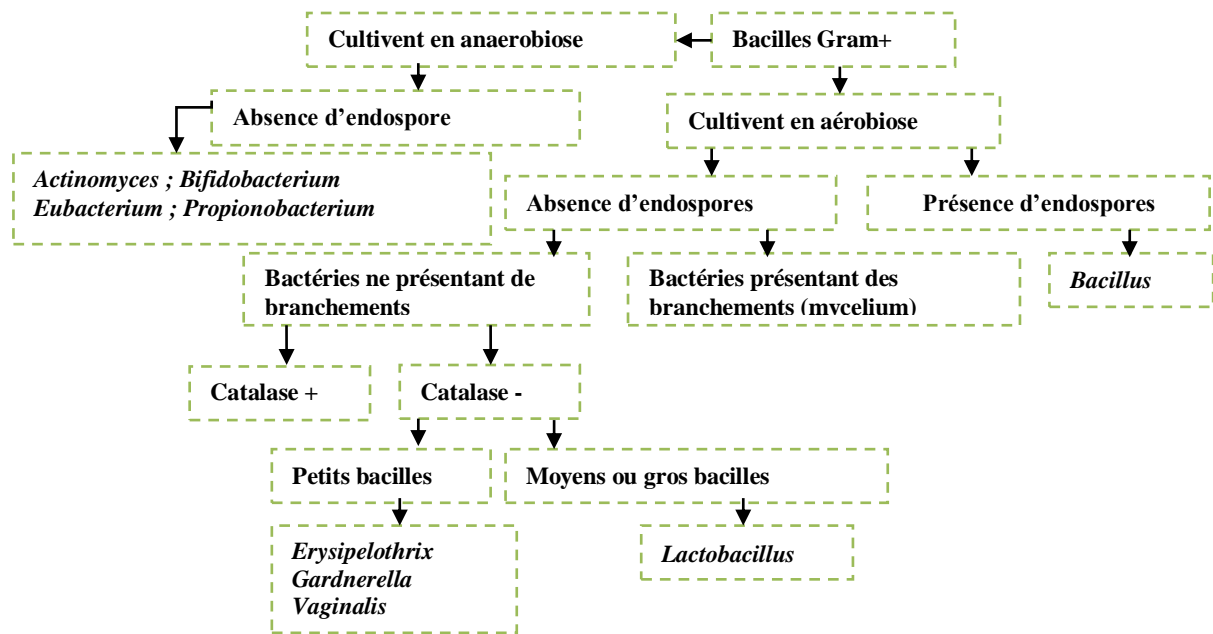


Figure n°30: Schémas d'identification dichotomique des bacilles à Gram positif (Leyral et Joffin, 1998)

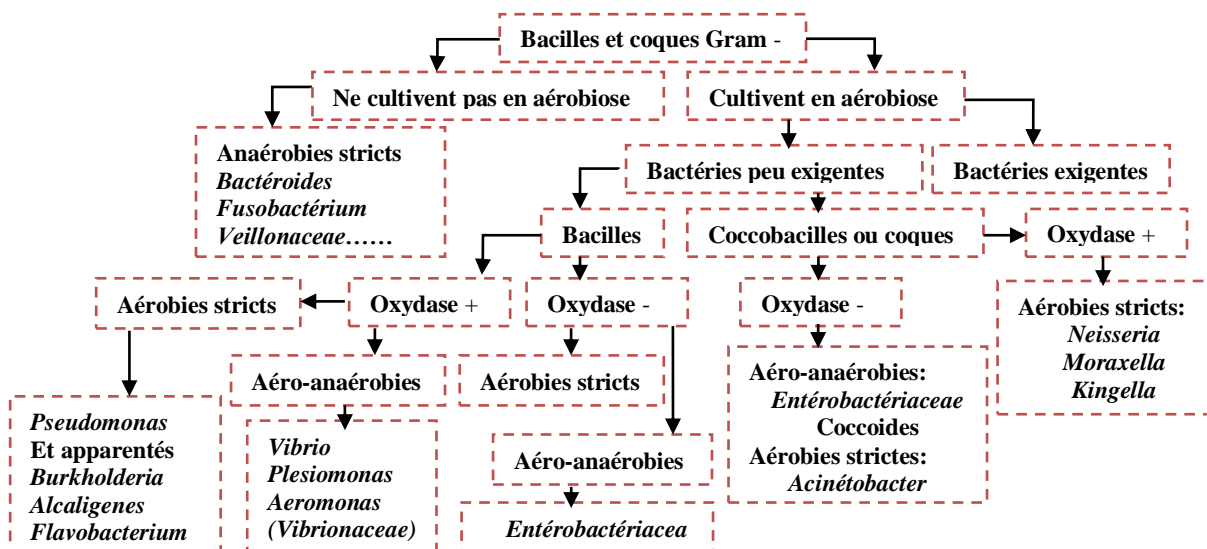


Figure n°31: Schémas d'identification dichotomique des bacilles et coques à Gram négatif (Leyral et Joffin, 1998)

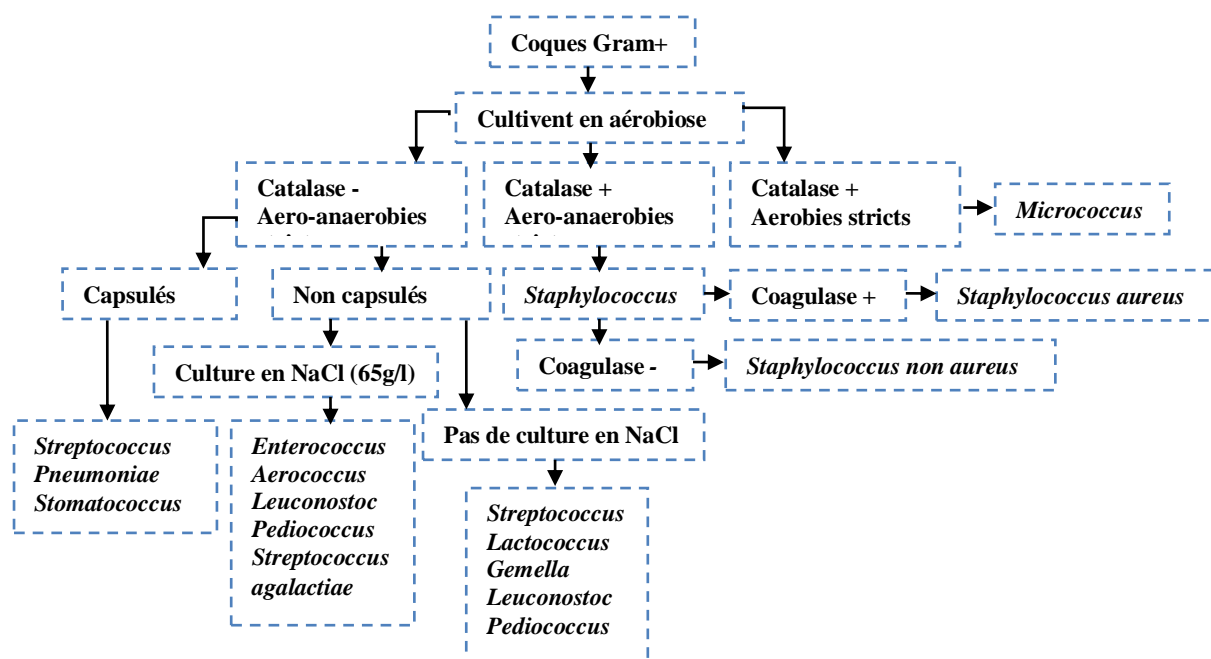


Figure n°32: Schémas d'identification dichotomique des coques à Gram positif (Leyral et Joffin, 1998)

I.4.9.4. La conservation des souches microbiennes

Toutes les souches isolées ont été ensemencées en bouillon nutritif (bactérie) ou en bouillon Sabouraud (champignons microscopique) additionné 15% de glycérol (Vlachojann et al., 2018) et conservés à -20°C pour utiliser ultérieurement. Chaque tube a porté toutes les informations concernant la souche isolée (nom de la souche conservée, milieu d'isolement, date de conservation, code du patient).

I.4.9.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne (*in vitro*)

I.4.9.5.1. Préparation des solutions des extraits

Des solutions mères de l'huile essentielle (HE) et d'extrait méthanolique (EM) ont été préparés dans le dimethyl sulfoxyde (DMSO: C₂H₆OS), très pure (99%) qui ne possède aucune efficacité antimicrobienne (evaluer par la méthode des disques). La stérilisation des solutions est assurée par un papier filtre de 0.22µm.

I.4.9.5.2. Revivification et préparation des pré-cultures

Après la décongélation des souches conservées, des cultures microbiennes jeunes de 18h ont été préparées sur la gélose nutritive (bactéries) ou gélose Sabouraud (champignons microscopique).

Pour la fixation de l'inoculum dès le départ, une parcelle de colonie microbienne est diluée en bouillon nutritif (bactéries) ou en bouillon Sabouraud (champignons microscopique) pour avoir une densité optique de 0.08-0.1 à 620 nm qui est équivalent à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml (Shafiei et *al.*, 2012).

I.4.9.5.3. Activité antimicrobienne (*in vitro*) par la méthode de microdilution

La méthode spectrophotométrique est utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (CMB) (Obame et *al.*, 2007), et pour une estimation quantitative de l'activité des extraits de la graine *N. sativa* sur la croissance microbienne durant des temps d'incubations variables (0h, 2h, 18h, 24h, 48). La cinétique de croissance est réalisée en microplaque de 96 puits. Dans chaque puit, on a porté 50µl de bouillon nutritif (bactérie) ou bouillon de sabouraud (champignons microscopique), puis 50µl de l'extrait dilué est ajouté en premier puit. Ensuite, une série des diluions est préparé. Enfin, dans chaque puits, 50µl de suspension microbienne est ajoutée ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml). En parallèle, des tests témoins ont été réalisés. Les microplaques sont recouvertes par un papier aluminium stérile et incubé à 37°C (bactéries) ou à 25°C (champignons microscopique) en conditions atmosphériques (bactéries anaérobies facultatives) ou en jarre anaérobie (bactéries anaérobies stricte). La cinétique de croissance microbienne est suivie à 620nm par un spectrophotomètre d'absorption moléculaire (TECAN).

I.4.9.5.4. Activité antimicrobienne (*in vitro*) par la méthode de diffusion sur Agar (méthode des puits)

L'activité antimicrobienne des extraits de *N. sativa* est testée selon la méthode Abu-Al-Basal (2009) modifiée dans laboratoire. L'utilité de la méthode des puits pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits naturels est confirmé par Balouiri et *al.*, (2016). Après la solidification de la gélose de Mueller Hinton en boîtes de Pétri (9 cm de diamètre), trois

puits de 4 mm de diamètre ont été coupés dans chaque boîte. 100µl d'une suspension microbienne ($1-2 \times 10^8$ UFC / ml) a été étalée sur la gélose. L'inoculum est laissé à séché pendant 15 min. Ensuite, 50µl de différentes concentrations d'HE (16500µl/ml et 8250µl/ml) ou d'EM (125000µl/ml et 62500µl/ml) ont été ajoutés séparément dans chaque puits. Un antibiogramme (ATM, CZ, L, P, SP) est réalisé sur certaines souches isolées pour le test positif et le DMSO a été utilisé comme un test négatif.

Les boîtes de Pétri ont été incubées dans des conditions atmosphériques normale (bactéries anaérobies facultatives) et dans un jarre anaérobie (bactéries anaérobies strictes) à 37°C pendant 18h (à 25°C pour les levures), les diamètres des zones d'inhibitions est mesurés en millimètres (mm) et tous les tests ont été réalisés en triple.

I.4.10. Formulation des émulsions aux extraits naturels de la graine *N. sativa* et Tween 80

Des émulsions pharmaceutique H/E ont été formulés selon le protocole proposé par Atba (2008), et modifié au laboratoire. Une série de concentrations (0.1%,0.15%,0.2%, 0.3%,0.4% ,0.6%,1.25% ,2.5%,5%) en tween 80 (tensioactifs de HLB 15) nous a permis d'évaluer la facilité de dispersion de la phase dispersée (HE ou EM) en phase dispersante (ED), le mélange est agité par un vortex pendant 1-3 mn à température ambiante.

I.4.11. Test de résistance des émulsions

La résistance des émulsions homogènes aux conditions sévères est testée par l'application d'une centrifugation de 2000tr/mn pendant 1,2, 4, 5, 10, 15, 20, 25 et 30mn (Mohamed et al., 2014). Toutes les modifications sont enregistrées.

I.4.12. Examen microscopique des émulsions

Un microscope optique équipé d'une caméra digitale (MDCE-5C) est utilisé pour l'observation microscopique des émulsions. A l'aide d'un logiciel d'acquisition et de traitement des images **Mesurim Pro®** (Atma, 2016), l'analyse granulométrique des émulsions est effectuée par la mesure de diamètre moyen de 100 gouttelettes (annexe IV). Les résultats

sont exprimés en diamètre \pm SD. La stabilité d'une émulsion est favorisée par un faible diamètre des gouttelettes (Touzouirt et *al.*, 2016).

I.4.13. Étude de stabilité des émulsions de *N. sativa*

Ce test est réalisé selon le protocole recommandé par Sulaiman et ses collaborateurs (2014) et modifié au laboratoire. Les formulations les plus résistantes à la centrifugation sont filtrées (papier filtre de 0.45 μ m) et conservées en stérilité, pendant 60 jours, à différentes températures (4°C, 20°C, 40°C), à l'abri de la lumière pour évaluer la stabilité physico-chimiques, microbiologique, macroscopiques et microscopiques (Sulaiman et *al.*, 2014 modifié au laboratoire).

I.4.13.1. Etude de la stabilité Physico-chimiques des émulsions de *N. sativa*

I.4.13.1.1. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur le pH et la conductivité électrique des émulsions

Pendant 60 jours, la stabilité des émulsions conservées à différentes températures (4°C, 20°C et 40°C) est suivie par la mesure de pH (pH mètre SensionTM HACH) et la conductivité électrique (conductimètre WTW).

I.4.13.1.2. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur la stabilité des émulsions par la spectrophotométrie UV-visible

Pour déterminer l'impact de la température et la durée de conservation sur la stabilité des formulations, des spectres d'absorption UV-visible des émulsions HE et EM ont été enregistrées sur la plage des longueurs d'ondes de 200 à 800 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (SP-UV-200S) (Manju et *al.*, 2016). La variation d'absorbance des échantillons conservés est notée à t_0 et après 60 jours de conservation à différentes températures.

I.4.13.1.3. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des émulsions

Le dosage est effectué selon la méthode de Bourgou et *al.* (2008); Salem et *al.*(2013a), respectivement (voir **I.3.4.**).

La teneur en composés phénoliques totaux et flavonoïdes dans les émulsions à base d'HE et d'EM est calculée en fonction des courbes d'étalonnages d'acide gallique et de catéchine successivement et les résultats sont exprimés en µg EAG/ml et µg EC/ml successivement.

I.4.13.2. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur la stabilité microbiologique des émulsions

Pendant 60 jours, la stabilité microbiologique des émulsions conservés à différentes températures (4°C, 20°C et 40°C) est déterminée par le dénombrement des germes totaux et des levures-moisissures par la méthode d'ensemencement en masse de la gélose nutritive (à 37°C / 24-72 heures) et d'agar Sabouraud (à 25°C/4-5 jours) successivement. Un contrôle négatif de l'eau distillé (ED) stérile (à 121°C/1 bar /15min) est réalisé dans les mêmes conditions. La recherche de *S. aureus* et de *Salmonella* est effectuée par la méthode des quadrants strié sur la gélose Chapman et Agar Hecktoen (à 37°C/24-48 heures) successivement.

I.4.13.3. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur la stabilité macroscopique et microscopique des émulsions

Par un examen visuel, l'apparence, la clarté, changement de couleur et toute précipitation ou séparation ont été enregistrés durant 60 jours (Sulaiman et *al.*, 2014). Ce type d'étude est une estimation de la stabilité d'une émulsion au cours du temps (Vaca Medina, 2010). En parallèle, un examen microscopique est réalisé (**I.4.12.**) pour étudié la stabilité microscopique.

I.4.14. Application (*in vivo*) de l'émulsion à base de l'huile essentielle de la graine *N. sativa*

30 malades (hommes) souffrants des gingivites ont été répartis en deux groupes; les patients du groupe I (15 patients) ont reçu une émulsion à base de l'huile essentielle de *N. sativa* et les patients du groupe II (15 patients) ont utilisés une ED stérile (test placebo). A chaque fois, le brossage des dents et le rinçage de la cavité buccale sont effectués par 10-15 ml de l'émulsion (ou test placebo) pendant 30 secondes.

Le traitement est appliqué après les repas, trois fois par jour (petit déjeuner, déjeuner, dîné) pendant une période de 21 jours. Aucun type des dentifrices ou des médicaments (antibiotique, anti-inflammatoire.....) n'est utilisé au cours de cette période.

I.4.14.1. Prélèvement des échantillons et l'analyse microbiologique

Les prélèvements microbiens ont été collectés la matinée (12 heures après le dernier brossage et 2 heures après le brossage du matin) par des écouvillons stériles étalés sur la plaque supragingivale, puis immergés dans 2 ml de l'eau physiologique stérile (solution mère) pour l'analyse microbiologique. Une série des dilutions de la solution mère (10^{-1} , 10^{-2} , ... 10^{-10}) est préparée et un dénombrement de la flore totale ($37^{\circ}\text{C}/24-72$ heures) avant et après le traitement pendant 21 jours est réalisés par la méthode d'incorporation de 1 ml de chaque dilution dans la masse d'agar nutritive.

I.4.14.2. Mesure de pH salivaire

Le pH salivaire des patients traités par l'émulsion d'HE et le PL est déterminé, la matiné (avant et après le traitement), par un papier pH pendant 21 jours.

I.4.14.3. Examen clinique

Chaque patient a subi un diagnostic oral pendant 21 jours de traitement par la mesure de 4 indices cliniques.

I.4.14.3.1. Indice gingival (IG) (Loe et Silness, 1963).

Quatre degrés de sévérité de l'inflammation gingivale sont évalués

- 0** = pas d'inflammation
- 1** = inflammation sans saignement
- 2** = inflammation + saignement provoqué
- 3** = ulcération + saignement spontané

I.4.14.3.2. Indice d'hygiène bucco-dentaire (IHB) (Greene et Vermillon, 1960)

Cet indice comprend deux composantes distinctes:

- a) L'indice de débris (ID)** qui mesure l'extension coronaire des dépôts mous jusqu'au premier, deuxième ou dernier tiers des faces vestibulaires ou linguales des dents:

- 0** = pas de débris
- 1** = 1/3 de la face est recouverte de débris
- 2** = 2/3 de la face est recouverte de débris
- 3** = toute la face est recouverte de débris

- b) L'indice de tartre (IT)** qui mesure l'extension coronaire correspondante de tartre sous-gingival sous la forme de dépôts isolés ou d'une bande continue:

- 0** = pas de tartre
- 1** = 1/3 de la face est recouverte de tartre
- 2** = 2/3 de la face est recouverte de tartre
- 3** = toute la face est recouverte de tartre)

Le score de l'IHB est la somme des scores de l>ID et de l'IT.

I.4.14.3.3. Indice de plaque (IPI) (Silness de Loe, 1964)

- 0** = pas de plaque
- 1** = un film adhère au bord marginal libre de la dent
- 2** = accumulation modérée de dépôt mou
- 3** = surface dentaire recouverte d'une quantité abondante de plaque

I.4.15. Analyses statistiques

Tous les tests physicochimiques, biochimiques et microbiologiques, ont été réalisés en duplicata ou triplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype. Une analyse de la variance (ANOVA) est réalisée et un test de comparaisons entre les groupes (test Student) est effectué pour les résultats *in vivo*. Pour les résultats de la cinétique microbienne, une différence de 1 Log UFC/ml (un standard microbiologique) entre deux temps est considéré comme significative (***P \leq 0.05**) (Molly et *al.*, 1993).



Résultats et discussions



II.1. L'extrait sec total (E.S.T.)

L'extrait sec total de la graine *N. sativa* de la région d'étude est de $98\% \pm 0.35$ ce qui correspond à une teneur en eau de 2%. Mraïhi *et al.*, (2008) montre que la teneur en eau de la même espèce d'origine de Tunisie, Libye et Arabie Saoudite est de l'ordre de 5.73; 9.33 et 12.66 % successivement tandis que d'autres études ont rapporté des valeurs variant entre 5.40-7.21% (Bessedik et Allem, 2013; Khoddami *et al.*, 2011; Atta, 2003; Salem, 2001c; Nergiz et Otles, 1993; Dandik et Aksoy, 1992) ceci confirme que la teneur en eau dépend généralement de conditions climatiques, de récoltes et de conservations.

II.2. Taux de cendre (T.C.)

Le taux de cendre est généralement stable, il indique la teneur en matière minérale. Dans notre étude, on a estimé une teneur de l'ordre de $4.4\% \pm 0.57$. En comparaison avec d'autres travaux, le T.C. varie entre 3.70 et 6.72% (Khoddami *et al.*, 2011; Atta 2003; Salem, 2001c ; Nergiz et Otles, 1993; Dandik and Aksoy 1992; Greenish, 1880).

II.3. L'huile essentielle

L'huile essentielle obtenue est de couleur jaune orangé et d'odeur forte et spécifique (annexe V) avec un rendement d'extraction de $0.45\% \pm 0.028$, Selon Benkaci-Ali *et al.*, (2007), le rendement d'extraction des huiles essentielles de la graine de *N. sativa* cultivée à Adrar, Ouargla, Timimoun et Médéa (Algérie) par l'hydrodistillation est de l'ordre de 0.18, 0.52, 0.08, et 0.33 % successivement. Alors que le rendement des mêmes échantillons obtenu par micro-ondes était légèrement supérieur à ceux d'hydrodistillation (0.20, 0.59, 0.11 et 0.37% successivement).

Dans une autre étude, le rendement des HE par Clevenger de deux échantillons des graines *N. sativa* cultivée à Syrie est entre 0.12 % e 0.15 % (Al Turkmani *et al.*, 2015). D'après Benkaci-Ali (2007) plusieurs facteurs influençant sur le rendement d'extraction : les conditions de culture, méthode d'extraction, la teneur en eau qui augmente le rendement par micro onde et empêche la par solvant, la nature du solvant utilisé (n- hexane) qui conduit à une récupération sélective des huiles essentielles.

II.4. Extrait brut méthanolique

L'extrait obtenu est d'aspect pateux, couleur brune foncé e d'odeur forte et spécifique, gout amer (annexe V) avec un rendement total de l'ordre de 10.9% ±1. En comparaison avec les résultats de Meziti (2009); Houcher et ses collaborateurs (2007) il apparaît que le rendement de l'EM par rapport au poids total est légèrement inférieur aux ces travaux.

II.5. Chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits de la graine *N. sativa*

D'après la bibliographie, très peu des travaux se sont intéressés par la séparation des composants des extraits de *N. sativa* par la CCM .Les résultats obtenus montrent que les systèmes de migration constitué par l'hexane - éther diéthylique - méthanol (4:1:0.15 v/v/v) et chloroforme - acétate d'éthyle - acide formique (5:4:1 v/v/v) sont les plus appropriés pour la séparation des molécules d'HE et d'EM. Suite à l'observation sous la lampe UV (336 nm) et la comparaison des Rfs des taches séparés avec ceux des témoins, nous avons déduit que la catéchine, l'acide gallique, la quercétine sont probablement présents dans les deux extraits, tandis que l'acide ellagique et la vanilline sont probablement présent dans l'EM et l'HE respectivement (tableau n°10). Cependant il existe des Rfs des spots issus des deux extraits qui ne correspondent à aucun Rf des témoins utilisés. D'autre part l'EM contient des composés qui n'existent pas dans l'HE (tableau n°10). Une analyse qualitative de l'HE de la graine *N. sativa* par CCM a révélé la présence la thymoquinone, le carvone, le thymol et le carvacrol (Lemaoui ,2010-2011).

Tableau n°10: Résultats de CCM

| | Phase mobile | |
|----------------------------------|--|---|
| | Hexane - éther diéthylique - méthanol (4:1:0.15 v/v/v) | Chloroforme - acétate d'éthyle - acide formique (5:4:1 v/v/v) |
| Quercétine | 0.09 | 0.45 |
| Acide Gallique | 0.38 | 0.45 |
| Acide éllagique | 0.25 | 0.6 |
| Catéchine | 0.23 | 0.2 |
| Vanilline | - | 0.62 |
| Extrait Méthanolique (EM) | 0.07, 0.10, 0.17, 0.23, 0.375, 0.26 | - |
| Huile Essentielle (HE) | 0.1, 0.22, 0.26, 0.34, 0.36, 0.76, 0.9 | 0.13, 0.19, 0.34, 0.48, 0.63 |

II.6. Analyse de l'huiles essentielle de la graine *N. sativa* par CPG-SM

Un total de 26 composés ont été identifiés en huile essentielle de la graine Algérienne *N. sativa* par GC-SM (figure n°33, tableau n°11) avec une grande richesse en thymoquinone (72.4973%). Piras et al. (2013), ont confirmé que la thymoquinone est le principal composé (77.2- 86.2%) dans quatre HE des graines *N. sativa* obtenues par extraction au CO₂-supercritique et selon le groupe de recherche de Benkaci-Ali, l'HE de la graines de *N. sativa*, cultivées à Adrar (Algérie), extraites par distillation à l'aide de micro-ondes, hydrodistillation et l'hydrodistillation de l'extrait hexanique contiennent 21.8%, 24.6% et 46.7% de thymoquinone successivement (Benkaci-Ali et al.,2010; Benkaci-Ali et al., 2007), alors que d'autres études ont montré que la teneur en thymoquinone des HE *N. sativa*; de différentes origines; extraites par l'entraînement à la vapeur, distillation avec micro-ondes et l'hydrodistillation par Clevenger est inférieure à 40 % (Edris et al.,2016 ; Rizvi et al.,2012; Adamu et al., 2010; Singh et al., 2005). Ces résultats ont confirmé l'efficacité de notre technique pour l'extraction du principe actif le plus abondant de l'HE de la graine *N. sativa*.

Grâce à cette étude, nous avons confirmé également la présence d'autres substances bioactives étaient déjà identifiées par Benkaci-Ali et al. (2010; 2007) mais avec des proportions différentes, ce qui confirme l'influence de la technique d'extraction sur la nature et la concentration des principes actif en HE (figure n°33, tableau n°11).

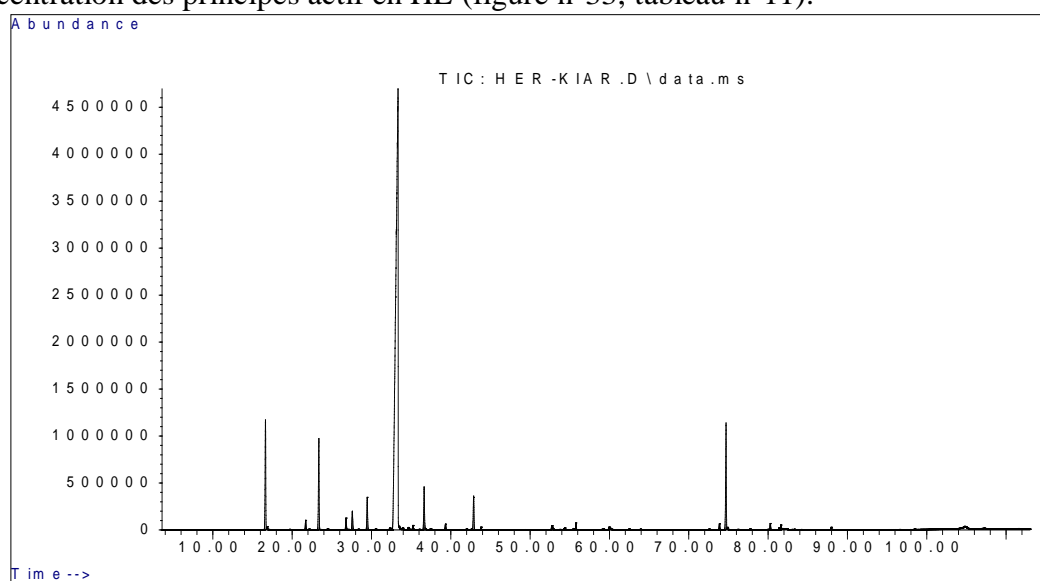


Figure n°33: CG-SM Chromathogramme de l'huiles essentielle des graines *Nigella sativa* (Qsar Konta, Adrar -Algérie) extraite par l'entraînement à la vapeur (*ex situ*)

Tableau n°11: Composition chimique de l'huile essentielle des graines de *Nigella. sativa* de Qsar Konta, Adrar (Algérie) extraite par l'entraînement à la vapeur (*ex situ*)

| N° | RT | KI | % | Composants |
|----|--------|------|---------|--|
| 1 | 13,36 | 976 | 0.0091 | Sabinene |
| 2 | 16,64 | 1025 | 5.2298 | para-cymene |
| 3 | 16,86 | 1028 | 0.1627 | Lymonene |
| 4 | 17,045 | 1031 | 0.0167 | 1,8-Cineole |
| 5 | 19,68 | 1068 | 0.0209 | cis-Sabinene hydrate |
| 6 | 22,13 | 1102 | 0.0315 | Linalool |
| 7 | 23,37 | 1119 | 4.5120 | cis p-Menth-2-en-1-ol |
| 8 | 25,13 | 1144 | 0.0123 | Camphor |
| 9 | 26,79 | 1167 | 0.6168 | 1,4-Dimethyl- δ -3-tetrahydroacetophenone |
| 10 | 27,59 | 1178 | 0.9863 | 4-Terpinenol |
| 11 | 29,47 | 1204 | 1.6862 | Cymen-9-ol <para-> |
| 12 | 32,32 | 1245 | 0.1168 | carvone |
| 13 | 33,33 | 1260 | 72.4973 | Thymoquinone |
| 14 | 35,23 | 1287 | 0.2363 | Bornyl acetate |
| 15 | 36,05 | 1299 | 0.0022 | trans-Pinocarvyl acetate |
| 16 | 36,64 | 1308 | 2.2828 | Carvacrol |
| 17 | 39,33 | 1349 | 0.2860 | Longipinene <alpha-> |
| 18 | 41,98 | 1389 | 0.0258 | beta-elemène |
| 19 | 42,6 | 1399 | 0.0383 | Sibirene |
| 20 | 42,88 | 1403 | 1.7870 | isolongifolene |
| 21 | 43,81 | 1419 | 0.1338 | (E)-Caryophyllene |
| 22 | 52,74 | 1567 | 0.2929 | 2',4'-Dihydroxy-3'-methylacetophenone |
| 23 | 54,36 | 1594 | 0.0109 | 1-Hexadecene |
| 24 | 55,47 | 1614 | 0.0638 | Tetradecanal |
| 25 | 74,7 | 1895 | 4.9534 | 2,3-Dihydrofarnesyl acetate |
| 26 | 74,87 | 1896 | 0.1138 | Tetradecyl butyrate |

II.7. Analyse par chromatographie liquide Ultra Performante couplée à spectrométrie de masse (UPLC-SM)

Une lecture globale des chromatogrammes a révélé la présence de plus de 20 métabolites en extrait méthanolique de la graine Algérienne de *N. sativa*. Plusieurs pics ont été détectés dans un intervalle de temps de 1-12 mn. Ils avaient des réponses en absorbance beaucoup plus élevée dans le domaine de l'UV. Selon des recherches similaires effectuées auparavant de Farag et ses collaborateurs (2014), ces composés organiques sont de nature phénolique. D'autres pics ont été constatés dans un intervalle de temps de 12 à 30 mn sont

enregistrés dans le chromatogramme (figure 34, **d**). Les substances chimiques de ces pics n'ont aucune absorbance optique à 370 nm et 330 nm. Ceci suggère l'absence des chromophores puissants dans nos acides gras contenant dans l'extrait méthanolique. Pareille, l'absorbance optique n'a pas été enregistré pour d'autres substances chimiques où leurs absorptions pourraient être à d'autres longueurs d'onde. Ceci est constaté par l'analyse des spectres de la figure 34 (**a, b, c, d**).

L'analyse par spectrométrie de masse couplée au chromatographe a montré que la séparation était pour 13 molécules. La fragmentation de certaines molécules n'a pas été prometteuse, car le nombre de fragment était minime. Ceci est attribué au poids moléculaire élevé qui a besoin d'une énergie élevée et à la polarité de la molécule pour faciliter la fragmentation.

Des chercheurs scientifiques dans le domaine ont justifié la difficulté de détection de certaines molécules par les problèmes dus à la méthode de fragmentation appliquée. Par exemple, selon Carpéné (2013), lorsque la source d'ionisation en spectromètre de masse est l'Electrospray, le passage de la solution à travers un tube capillaire aboutit à la formation d'un spray des gouttelettes dont la surface est chargée; et sous l'effet d'un gaz chauffé, le solvant s'évapore et les gouttelettes rétrécissent, d'où la promiscuité des charges dans les petites gouttelettes provoque des explosions continues de celles-ci en plus petites gouttelettes jusqu'à atteindre la phase gazeuse. À cette étape, les molécules sont concentrées et produit souvent un effet supprimeur qui peut masquer un composé par un autre présent dans le mélange. Ce phénomène empêche souvent l'analyse du composé d'intérêt.

Nous rappelons, selon ce chercheur que l'effet supprimeur est minime lorsque les composés présents dans le mélange ont les mêmes propriétés et devient maximal en raison de la présence de plusieurs composés dans la solution. Ce chercheur a ajouté, aussi, que L'ESI produit moins de fragmentation avec ce type de source d'énergie.

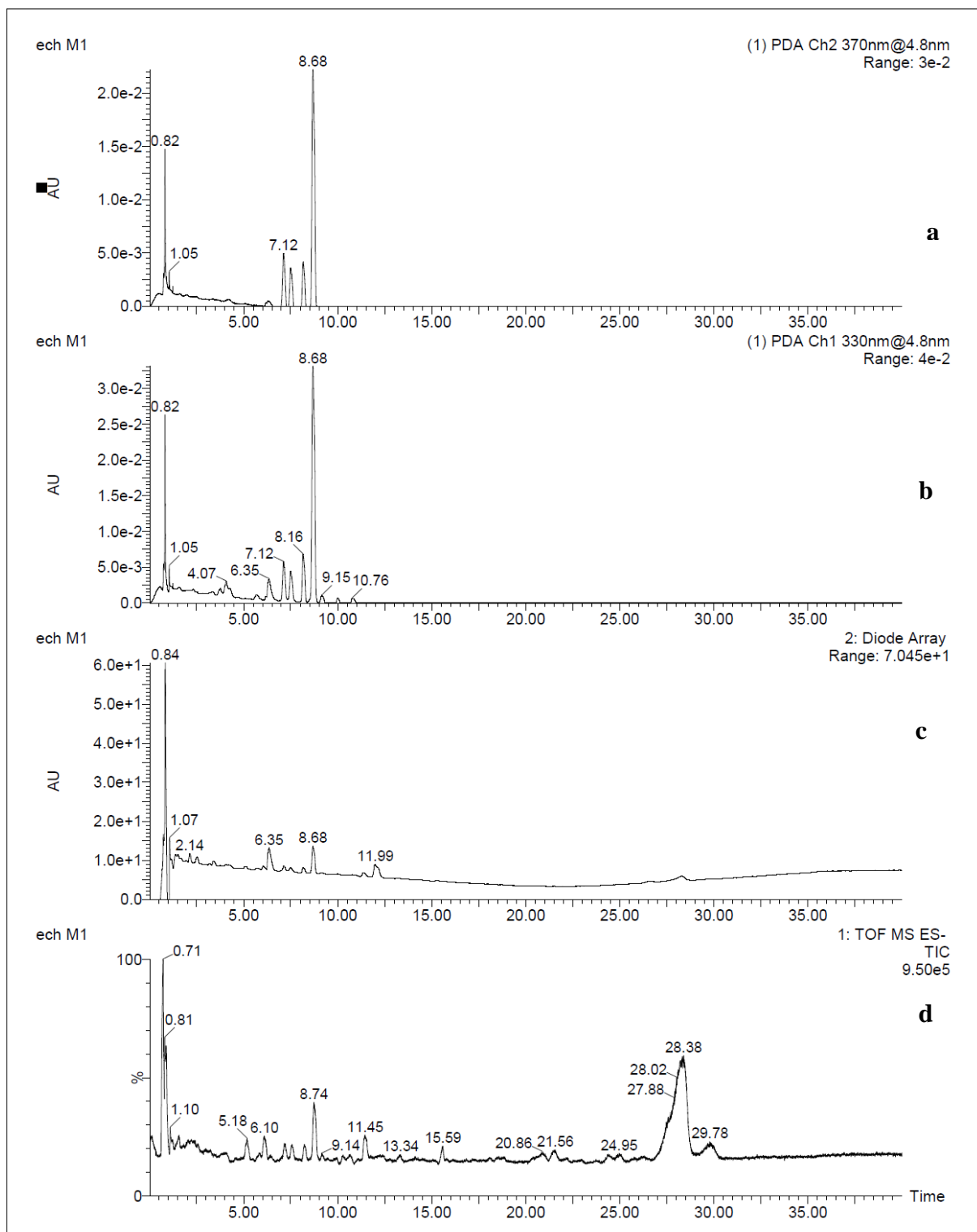


Figure n°34 : Résultats de UPLC-PDA de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne *Nigella sativa* (**a:** pics détectés à 370nm, **b:** pics détectés à 330nm, **c:** pics détectés à diode array, **d:** Chromatogramme d'UPLC)

Nos analyses spectrales d'UPLC-SM, cités dans les figures 35, 36, 37,38 et 39 ont été comparés avec ceux du chercheur Farag et ses collaborateurs (2014) où ils ont analysé des extraits méthanoliques de treize échantillons de la graine *Nigella* dont six échantillons de l'espèce *N. sativa* d'origines différentes.

Le spectre de masse n°1 (figure n°35) a révélé la présence d'un pic de $m/z = 933,2646$ semblable à celui qui a été détecté par Farag et ses collaborateurs ($m/z = 933,258$). La molécule identifiée était Quercetin-O- α -rhamnosyl-triglucoside (flavonoïde) de formule brute $C_{39}H_{49}O_{26}$.

Un autre pic est détecté dans le spectre de masse n°2 (figure n°35), de masse unitaire $m/z = 489,1954$. En comparaison avec les résultats de Farag et *al.*, (2014), cette molécule est la Thymoquinol diglucoside (Phenol) de formule brute $C_{22}H_{33}O_{12}$ et $m/z = 489,1968$.

Ainsi, pour notre pic de masse $m/z = 771,2112$ enregistré sur le spectre n°4 (figure n° 36), la molécule pourrait être le Kaempferol 3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranosyl-(1-2)- β -glucopyranoside] ou le Quercetin-O- α -rhamnosyl-diglucopyranoside. Ces deux molécules sont des flavonoïdes de formule brute $C_{33}H_{39}O_{21}$ (Farag et *al.*, 2014). Ce raisonnement est basé selon les identifications moléculaires du Farag et ses collaborateurs ($m/z = 771,1919$ et $m/z = 771,1992$ successivement).

Nous avons constaté sur le spectre de masse n° 5 (figure n° 36) un pic de masse unitaire $m/z = 917,2762$. Selon Farag et *al.* (2014), il pourrait être celui de la Kaempferol-3-O-sophorotrioside-7-O-rhamnoside (Flavonoïde) dont la formule brute est $C_{32}H_{53}O_{30}$, et $m/z = 917,2634$.

Le spectre de masse n°13 (figure n°39) montre un pic de $m/z = 749,4653$ qui est, probablement, la saponine Tauroside E de formule générale $C_{41}H_{65}O_{12}$, selon les résultats de Farag et *al.*(2014), la même molécule a une masse unitaire de $m/z = 749,4503$. Un autre pic, sur le même spectre, est enregistré de $m/z = 1219,6416$ qui est pourrait être la saponine Tauroside H2 de formule brute $C_{59}H_{95}O_{26}$, divulgué par Farag et *al.*, (2014) dont la $m/z = 1219,6226$.

La très faible différence en masse unitaire entre nos résultats et les travaux scientifiques du Farag et ses collaborateurs se situent dans les chiffres après virgules. Ceci pourrait être dû aux analyses effectuées sans observation de la stabilisation de l'intensité de la source d'ionisation ou au vieillissement de l'appareil d'analyse.

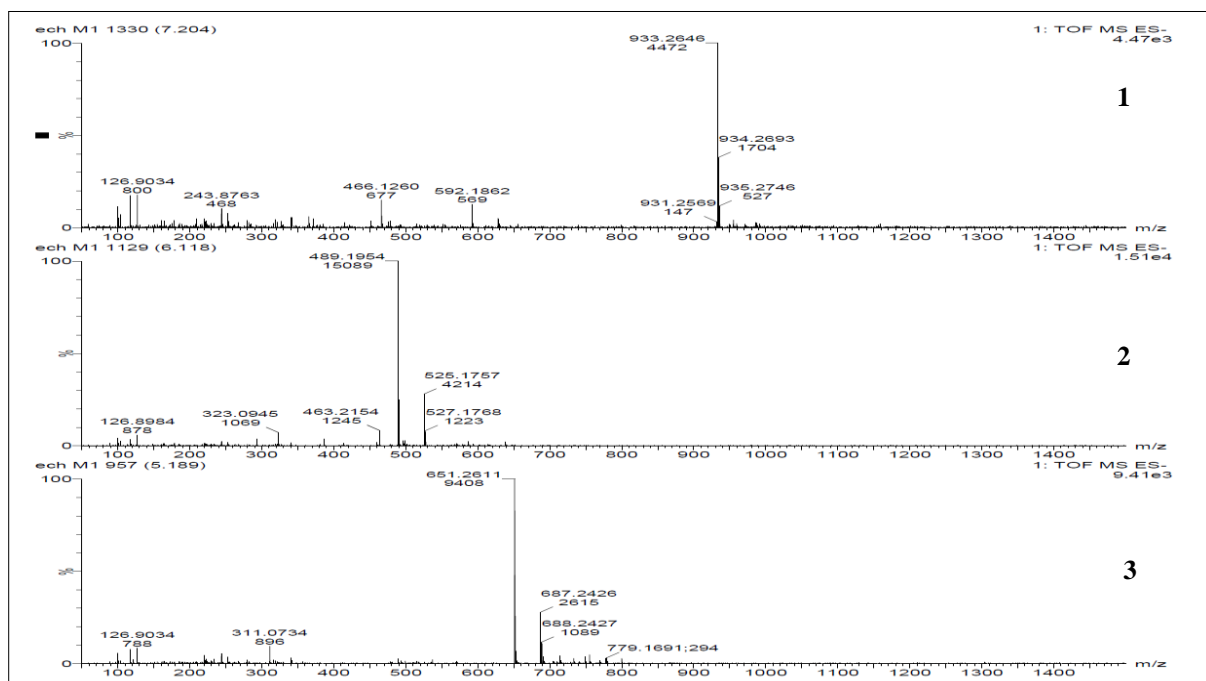


Figure n°35: Spectres de masse de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne *Nigella sativa* (1, 2, 3)

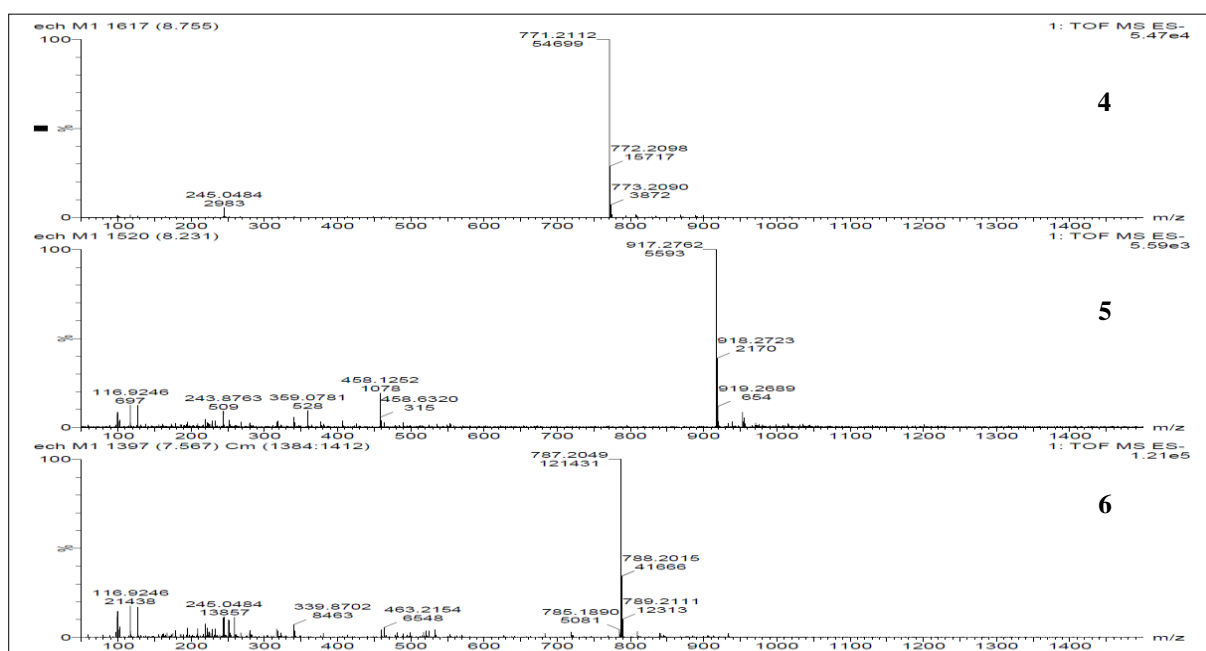


Figure n°36: Spectres de masse de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne *Nigella sativa* (4, 5, 6)

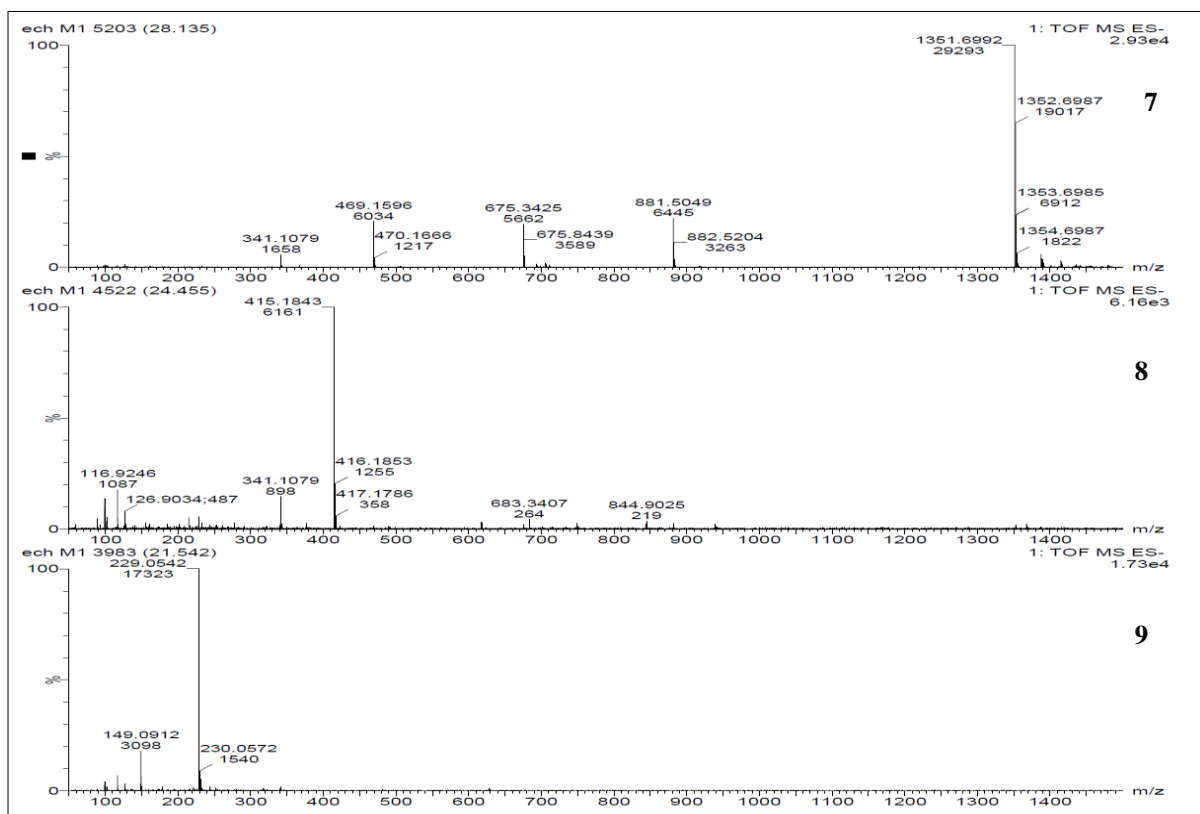


Figure n°37: Spectres de masse de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne *Nigella sativa* (7, 8, 9)

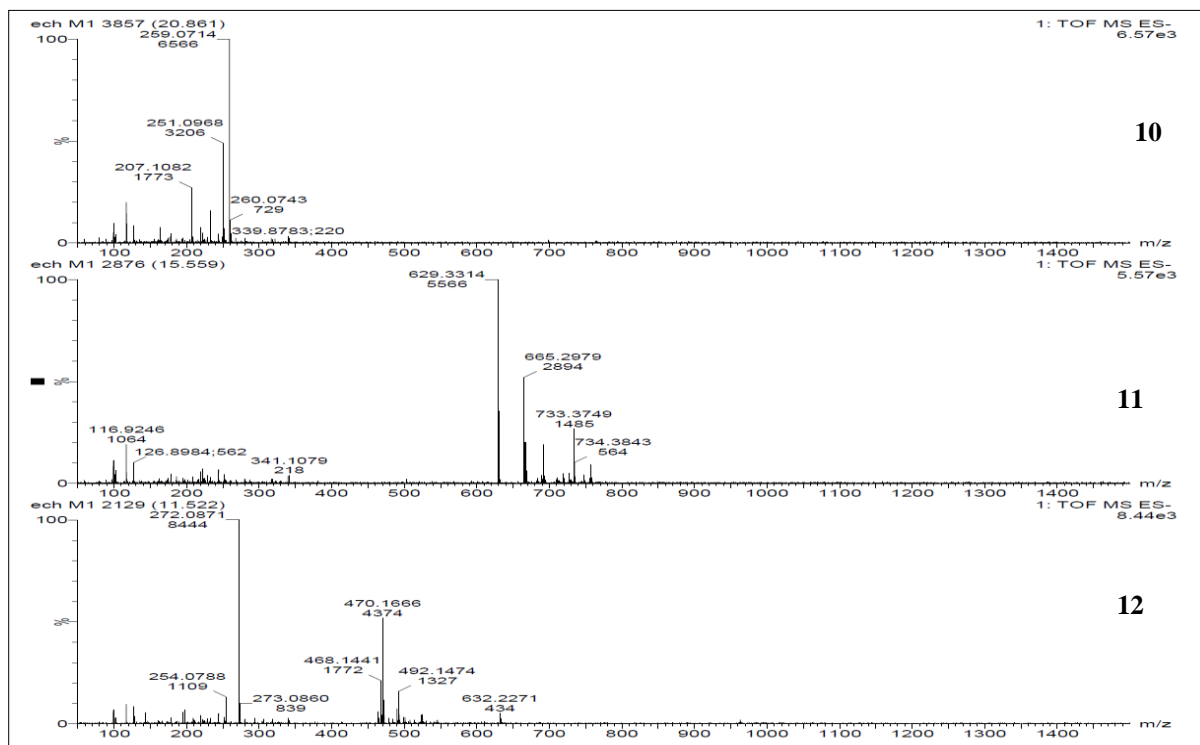


Figure n°38: Spectres de masse de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne *Nigella sativa* (10, 11, 12)

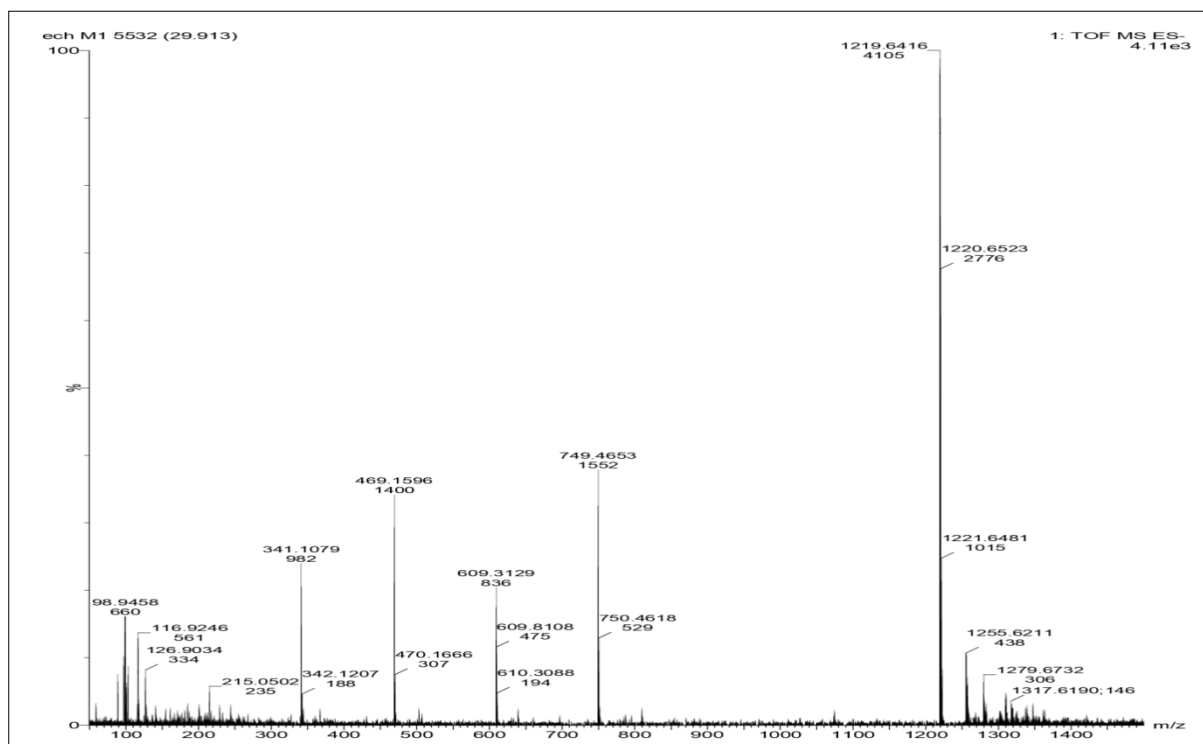


Figure n°39: Spectre de masse de l'extrait méthanolique de la graine Algérienne *Nigella sativa* (13)

II.8. Résultats d'analyse par la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

En lecture globale de tous les spectres (figure n°40, **a,b,c,d,e**), on a remarqué des bandes de vibrations à 2925, 2922 cm^{-1} résultant d'élongation moyenne de la liaison aliphatique C-H (dans un groupe aromatique méthoxyle, dans les groupes méthyle et méthylène de chaînes latérales) et une autre bande est enregistrée à 2854 cm^{-1} de vibration d'élongation du groupement C-H aromatique. Nivetha et Prasanna (2016), ont confirmé que ces bandes détectées indiquent la présence des alcanes. Mohammed et ses collaborateurs (2016) ont révélé également la présence des bandes de vibration de C-H (CH_3 aliphatique) en extrait obtenus par pression à froid et en HE de la graine de *N. sativa*.

Dans la région de 1500-1300 cm^{-1} , plusieurs bandes sont observées correspondant à une vibration d'élongation des liaisons C-N et une autre bande est détectée à 1600 cm^{-1} correspond à une déformation dans le plan de groupement N-H des amides. Une bande située

à 1715 cm^{-1} (figure n°40, **a,b**) et une autre à 1167 sont probablement attribuées à une élongation du groupement C=O et C-O des esters successivement (Mohammed et *al.*,2016).

D'après le spectre IRTF de l'EM (figure n°40, **b**), on note une large bande entre 3000-3500 cm^{-1} , elle est maximal à environ 3300 cm^{-1} résultant d'une vibration d'élongation de O-H, elle est probablement attribuée à des alcools ou des phénols.

Des bandes ont été détectées à 1462 et 3378.8 cm^{-1} peuvent être dues aux vibrations d'élongations des groupements C-H des alcanes et N-H des amines successivement. Une autre bande de faible transmittance dans la région de 500-1000 (figure n°40, **d**) est enregistrée correspond à une vibration d'élongation de groupement =C-H des alcènes (Nivetha et Prasanna, 2016).

Les résultats de IRTF de l'HE de la graine de *N. sativa* rapportés par Manju et *al.*(2016), ont confirmé la présence des fortes bandes d'absorption représentant l'élongation O-H et C-H des polyphénols. Des bandes d'absorption des groupements fonctionnels C = O; C-H des alcanes et des cycles aromatiques ont été également détectés.

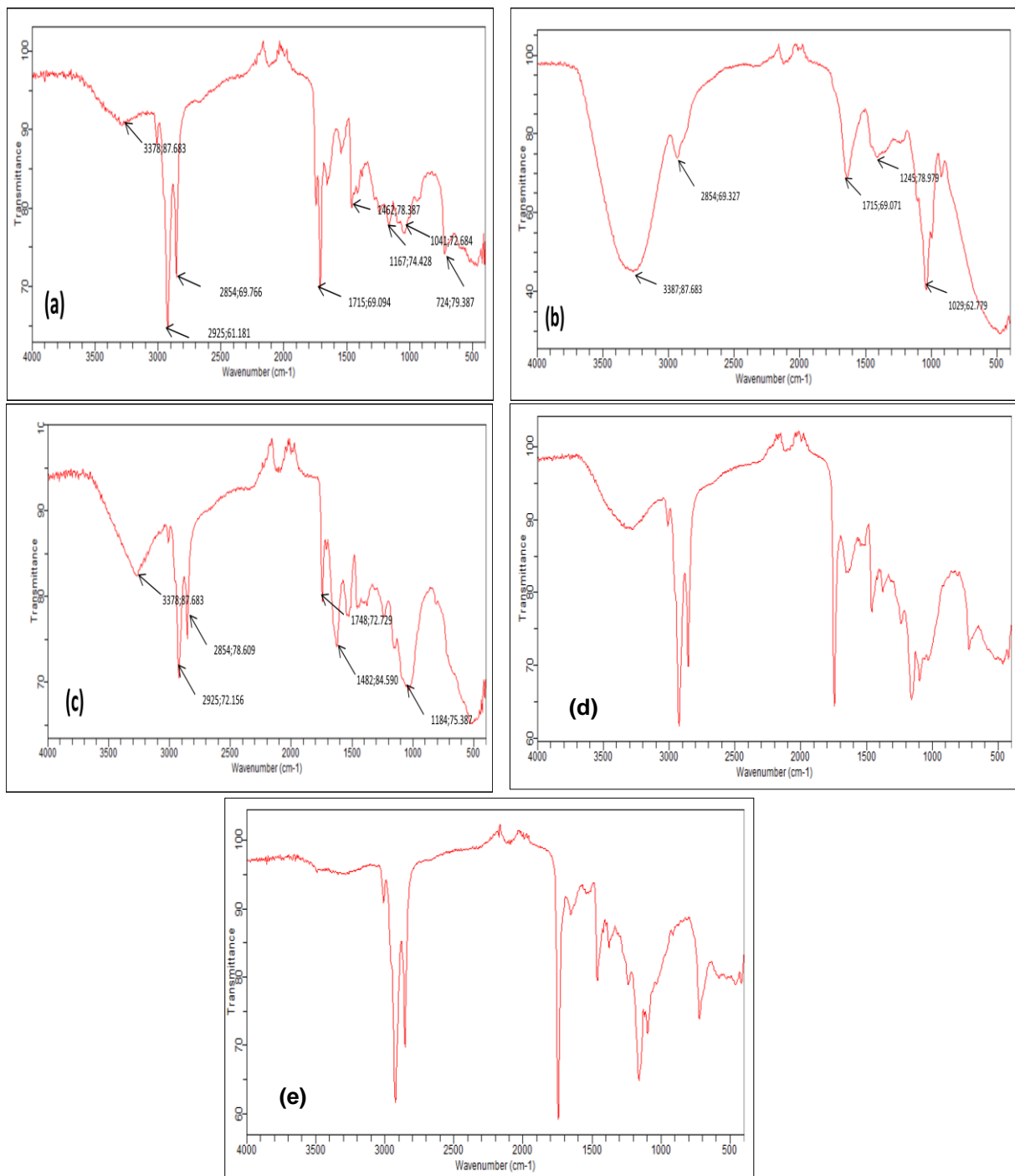


Figure n°40: Résultats de IRTF de *N. Sativa* :**(a)** poudre de la graine avant l'extraction, **(b)** EM, **(c)** résidu d'extraction par macération, **(d)** HE, **(e)** résidu d'extraction par l'entraînement à la vapeur (*ex situ*)

II.9. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits de la graine *N. sativa*

Les résultats obtenus montrent la richesse de l'EM en polyphénols totaux et flavonoïdes ($28,1 \pm 3,5$ mg EAG/g extrait et $5,64 \pm 0,4$ mg EC/g d'extrait) par rapport à l'HE ($15,75 \pm 2$ mg EAG/g d'extrait et $2,150 \pm 0,5$ mg EC/g d'extrait).

Selon Mohammed et *al.*, (2016), 160,51 mg/100 ml de composés phénoliques ont été estimés dans l'HE des graines *N. sativa* procurées du marché d'épices en Malaisie occidentale, tandis que Meziti, et *al.*, (2012) montrent que l'EM (70%) de la même graines récoltées à Bordj Bou Arréridj (Algérie) et sa fraction apolaire extraite par l'hexane contiennent $33,64 \pm 0,34$ µg EAG/mg et $15,95$ µg EAG/mg respectivement alors que la teneur en flavonoïdes est de l'ordre de $3,80 \pm 0,07$ µg EQ/ mg et $0,43$ µg EQ/ mg successivement. Alors que El-Beshbishy et *al.*(2009), ont déclaré $14 \pm 0,05$ mg EAG/g d'un extrait méthanolique obtenu par macération.

En effet, la répartition qualitative et quantitative des composés phénoliques d'une plante dépend des facteurs intrinsèques et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) et selon Lee et *al.*(2003), la méthode d'extraction, de quantification, et la sélectivité du solvant utilisé peuvent également influencer sur la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes.

II.10. Etude *in vitro* de l'activité biologique des extraits de la graine *N. sativa*

II.10.1. Recherche, isolement et l'identification des microorganismes des malades parodontaux

Les résultats des analyses microbiologiques ont permis d'isoler 71 souches microbiennes à partir des cavités buccales des 12 patients souffrants des parodontites et gingivites (tableau n°12; annexe III). La flore isolée comporte onze bactéries à Gram positif, douze bactéries à Gram négatif et trois souches des levures microscopiques. Les souches microbiennes identifiées appartiennent aux 16 genres différents: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus sp* (coques à Gram positif), *Veillonella* (coques à Gram négatif), *Bacillus sp.* et *Lactobacillus* (bacilles à Gram positif), *Enterobacter*,

Stenotrophomonas, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Acinetobacter*, *Porphyromonas* (bacille à Gram négatif) et trois souches des levures microscopiques (*Candida albicans*, *Candida sp.* et *Sccharomyces*).

Nos résultats ont confirmé la présence des *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Porphyromonas sp.*, *Veillonella* identifiées dans plusieurs travaux (Hoceini et al., 2016; AFSSAP, 2011; INSERM, 1999) alors que des difficultés ont été rencontrés pour isoler les *Actinomyces* et d'autres bactérie anaérobies à Gram négatif.

Selon INSERM (1999), les plaques microbiennes des gingivites constituées principalement des bactéries à Gram-positif facultatives ou strictement anaérobies, y compris les espèces dominantes *Actinomyces* et *Streptococcus* dans les plaques supragingivale. Nous pouvons également isoler en faible proportion des bacilles à Gram négatif strictement anaérobies, alors que des bactéries à Gram négatif strictement anaérobies et des spirochètes adhérant à des bactéries Gram positif ont été isolées dans les pathologies parodontales.

Les *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia* sont considérés comme des principaux agents pathogènes de la périodontite et les espèces de *Veillonella* sont fréquemment associées à ces pathologies mais aucune activité pathogène n'a été attribuée à ce genre (AFSSAPS, 2001; INSERM, 1999).

Les espèces de *Streptococcus* sont la flore commensale de la cavité buccale humaine et peuvent jouer un rôle protecteur dans les maladies parodontales (Hillman et al., 1985) mais certaines souches comme les streptocoques du groupe D et *Enterococcus faecalis*, ne sont pas des microflores buccales commensales (Benbelaid, 2015; Aas et al., 2005; INSERM, 1999).

Les données actuelles de Souto et Colombo (2008) montrent que *E. faecalis* est fréquemment détectée dans la plaque subgingival des patients atteints des parodontites, ce qui laisse supposer qu'une infection parodontale pourrait favoriser la colonisation par cette espèce (Benbelaid, 2015). Les staphylocoques sont associés à des infections buccales, comme la gingivite et la parodontite juvénile locale (Rams et al., 1990). D'un autre côté, Tanner et al. (1994) ont rapporté que les *Micrococcus* ne sont pas des agents pathogènes majeurs, mais qu'ils sont parfois associés à des infections chez des patients immunodéprimés et que

certaines espèces de *Bacillus* sont associées à des infections humaines. Souto et *al.* (2014) ont montré que *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* sont fréquemment détectés dans les biofilms sous-gingivaux et la salive des patients atteints de parodontite chronique, alors que les entérobactéries et les levures sont des souches les plus isolées des cavités buccales des patients atteints de parodontite réfractaire (AFSSAPS, 2001). Les *Lactobacillus* et *Klebsiella pneumoniae* sont fréquemment isolées de la plaque supragingivale (Hoceini et *al.*,2016) et la présence des *Lactobacillus* et *Streptococcus mutans* en faible proportion indique un risque parodontal élevé alors que la prévalence des bacilles entériques (*Klebsiella pneumoniae*) est en rapport avec la santé buccale (Hoceini, 2017).

Tableau n°12: Les souches microbiennes isolées des cavités buccales des malades parodontaux

| | Sexe | Age (ans) | IP | IG | ID | IC | IHO | IPI | Souches microbiennes |
|---|------|-----------|----|----|----|----|-----|-----|---|
| P ₁ (G) | H | 56 | 8 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> |
| P ₂ (G) | F | 28 | 8 | 3 | 1 | 1 | 2 | 1 | <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , Streptocoque groupe D, <i>Staphylococcus aureus</i> |
| P ₃ (P) | H | 75 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Veillonella sp.</i> |
| P ₄ (P) | F | 32 | 6 | 3 | 1 | 1 | 2 | 1 | <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. durans</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Saccharomyces sp.</i> , <i>Veillonella sp.</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> |
| P ₅ (P) | F | 50 | 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | <i>Streptococcus sp.</i> , Streptocoque groupe D, <i>Streptococcus sp.</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Proteus sp.</i> , <i>Escherichia coli.</i> , <i>Veillonella sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Candida sp.</i> |
| P ₆ (G) | F | 48 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | <i>Escherichia sp.</i> , <i>S. epidermidis</i> , Streptocoque groupe D, <i>Candida sp.</i> |
| P ₇ (G) | H | 56 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | <i>S. epidermidis</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Candida sp.</i> |
| P ₈ (G) | F | 49 | 8 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | <i>S. aureus</i> , <i>Escherichia sp.</i> , Streptocoque groupe D, <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> |
| P ₉ (P) | F | 41 | 9 | 3 | 2 | 2 | 4 | 3 | <i>Klebsiella pneumonia ssp. Pneumonia</i> , <i>Porphyromonas sp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Acinetobacterbaumannii/calcoacetecus</i> , <i>Candida sp.</i> |
| P ₁₀ (G) | F | 24 | 6 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3 | <i>Micrococcussp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Saccharomyces sp.</i> |
| P ₁₁ (P) | F | 16 | 6 | 2 | 3 | 2 | 5 | 2 | Streptocoque groupe D, <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Acinetobacterbaumannii/calcoacetecus</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Klebsiellasp.</i> , <i>Candida sp.</i> |
| P ₁₂ (P) | H | 60 | 8 | 3 | 2 | 2 | 4 | 3 | <i>Acinetobacter baumannii/calcoacetecus</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Porphyromonas sp.</i> , <i>Klebsiella pneumonia ssp.</i> , <i>Pneumonia</i> , <i>Bacillus sp.</i> , Streptocoque groupe D, <i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> |
| <p>P:Patients; H: Homme; F:Femme; IP: Indice Parodontale; IG: Indice gingivale; ID: Indice de Debris; IC: Indice de tartre; IHO: Indice Hygiene Orale; IPI: Indice de plaque; (G) :gingivite ; (P) : Parodontite</p> | | | | | | | | | |

II.10.2. Activité antimicrobienne (*in vitro*)

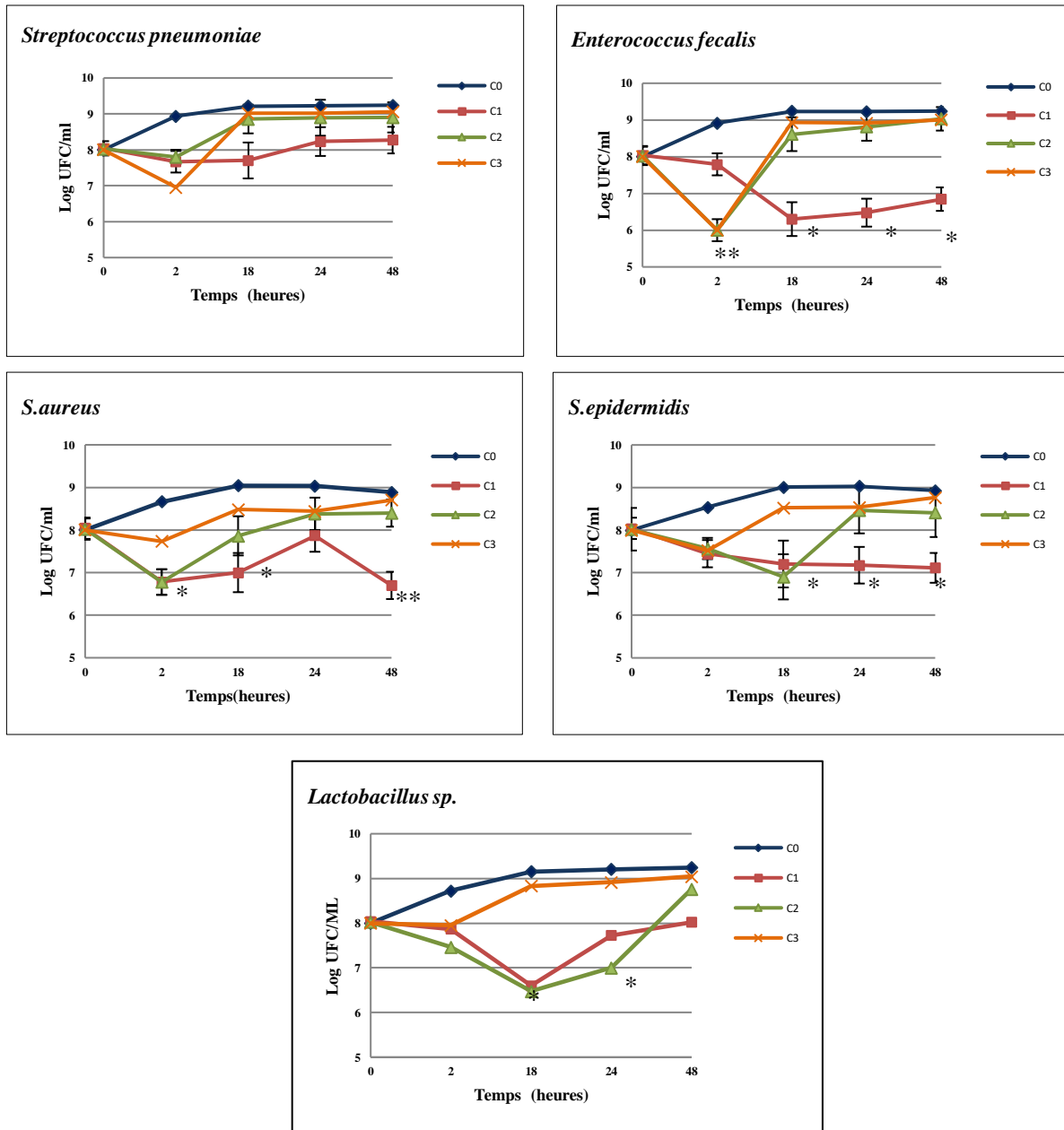
Les activités biologiques des HE et EM ont été testées contre cinq bactéries Gram-positif isolées des patients atteints les maladies parodontales (*S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Lactobacillus sp.*), sept bactéries Gram-négatif (*Porphyromonas sp.*, *Veillonella sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii / calcoaceticus*, *Proteus sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* anciennement *Pseudomonas maltophilia* et *Enterobacter aerogenes*) et trois souches de levures microscopiques (*Candida albicans*, *Candida sp.* et *Saccharomyces sp.*).

II.10.2.1. Méthode de microdilution

On a déterminé la cinétique bactéricide, fongicide, la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (CMB) et la concentration minimale fongicide (CMF) des extraits de *N. sativa*.

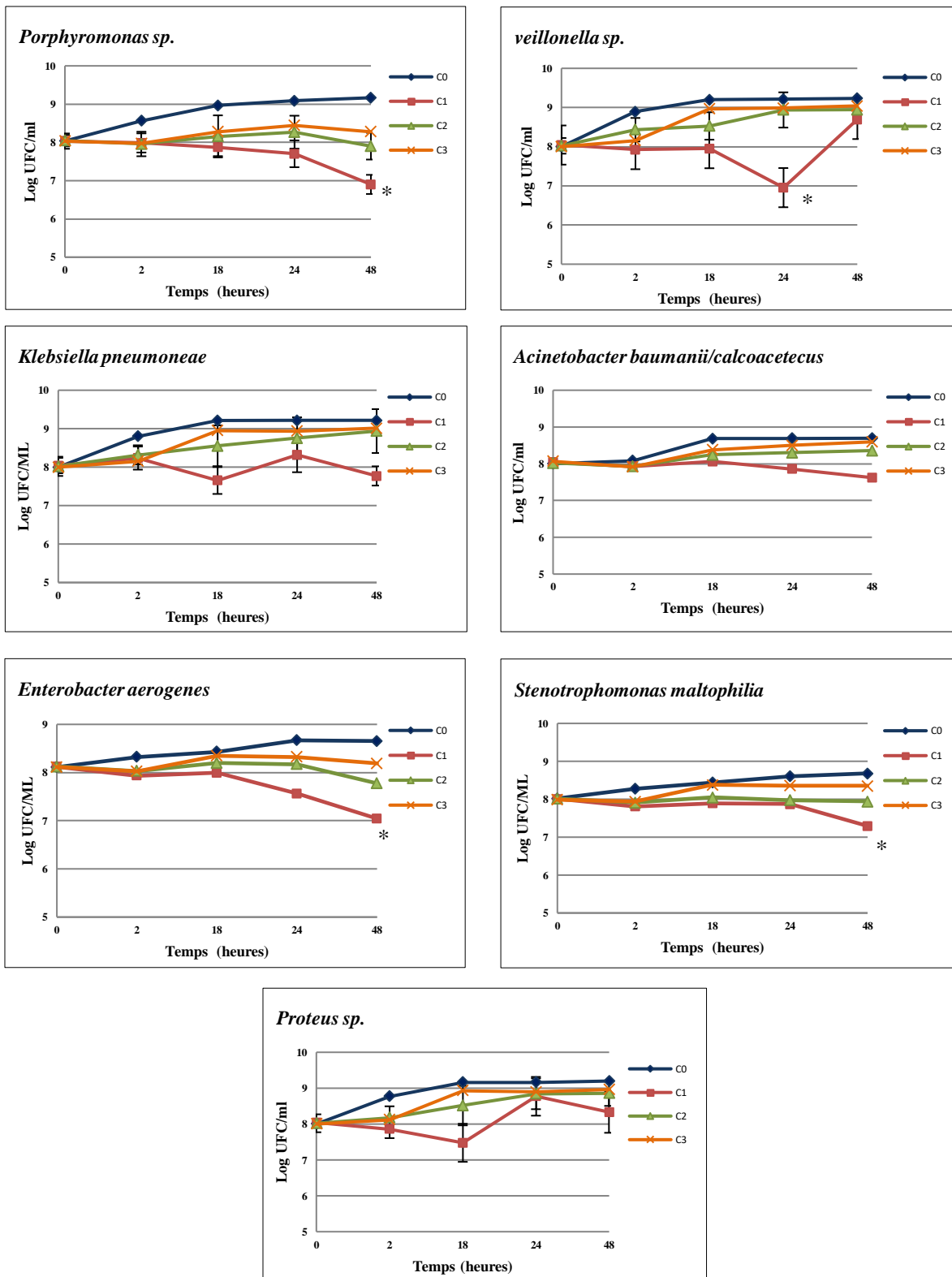
a) Activité antimicrobienne de l'huile essentielle

D'après les résultats obtenus (Figures n°41,42), l'HE a une activité bactéricide spécifique contre les microorganismes testés avec une inhibition remarquable des souches anaérobies (CMB: 16500µg/ml ; $P \leq 0.05$). Dans certains cas cette efficacité n'a pas atteindre le seuil de la significativité statistique ($p \geq 0,05$). Pour certaines souches, l'activité bactéricide est diminuée et la croissance microbienne est reprise après 18 à 24 heures d'incubation. *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus sp.* sont les bactéries les plus sensibles à l'HE (CMB: 8250µg / ml pendant 18 heures) alors que la concentration 16500µg/ml est la plus active contre *Enterococcus faecalis* *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Porphyromonas sp.* pendant 48 heures d'incubation.



C₀: Temoin; C₁:16500µg/ml; C₂:8250µg/ml; C₃:4125µg/ml

Figure n°41: Effet de l'huile essentielle de la graine *N. sativa* sur la croissance des bactéries pathogènes à Gram positif (*P ≤ 0.05)

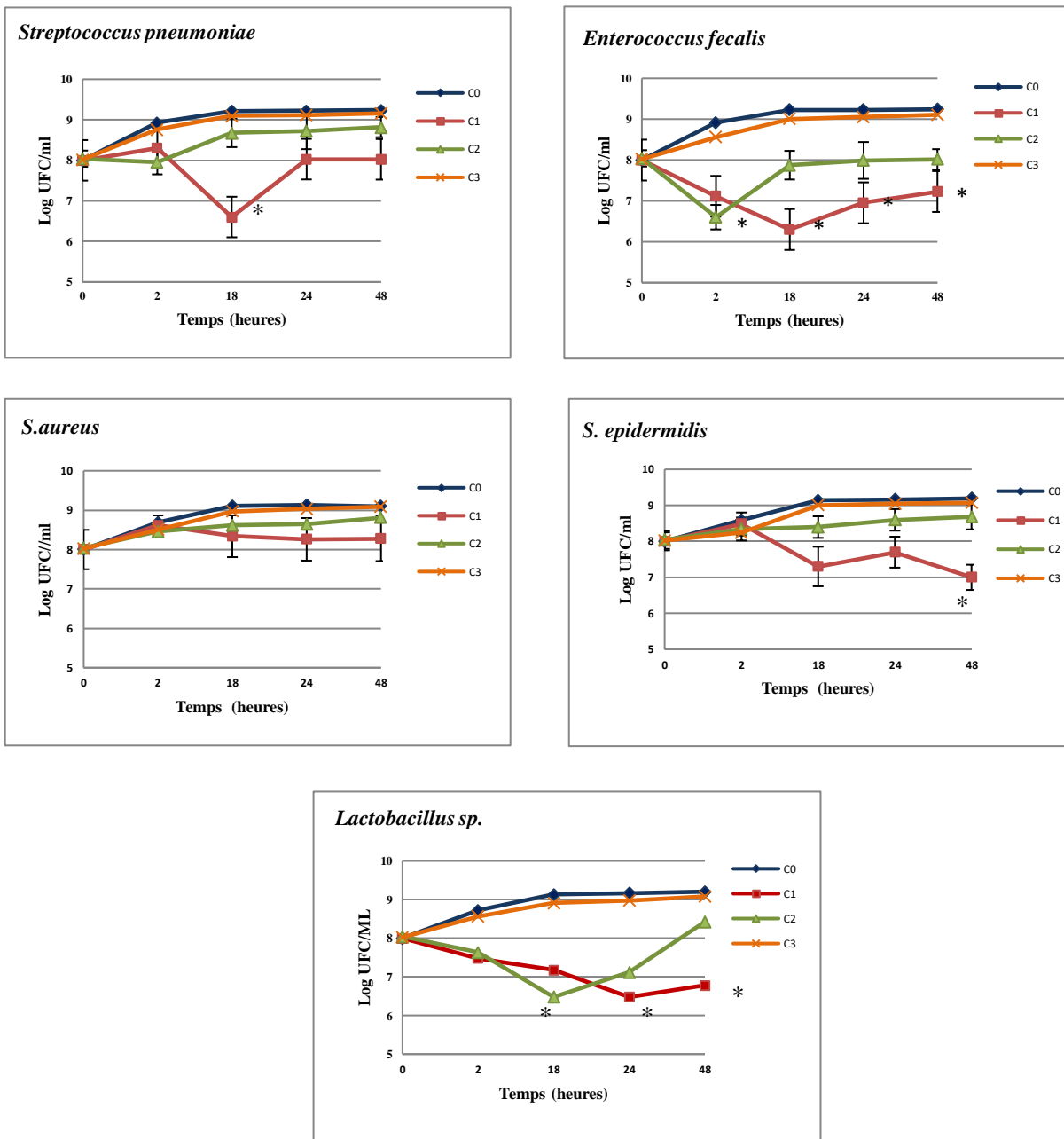


C₀: Temoin; C₁:16500µg/ml; C₂:8250µg/ml; C₃:4125µg/ml

Figure n°42: Effet de l'huile essentielle de la graine *N. sativa* sur la croissance des bactéries pathogènes à Gram négatif (*P≤0.05)

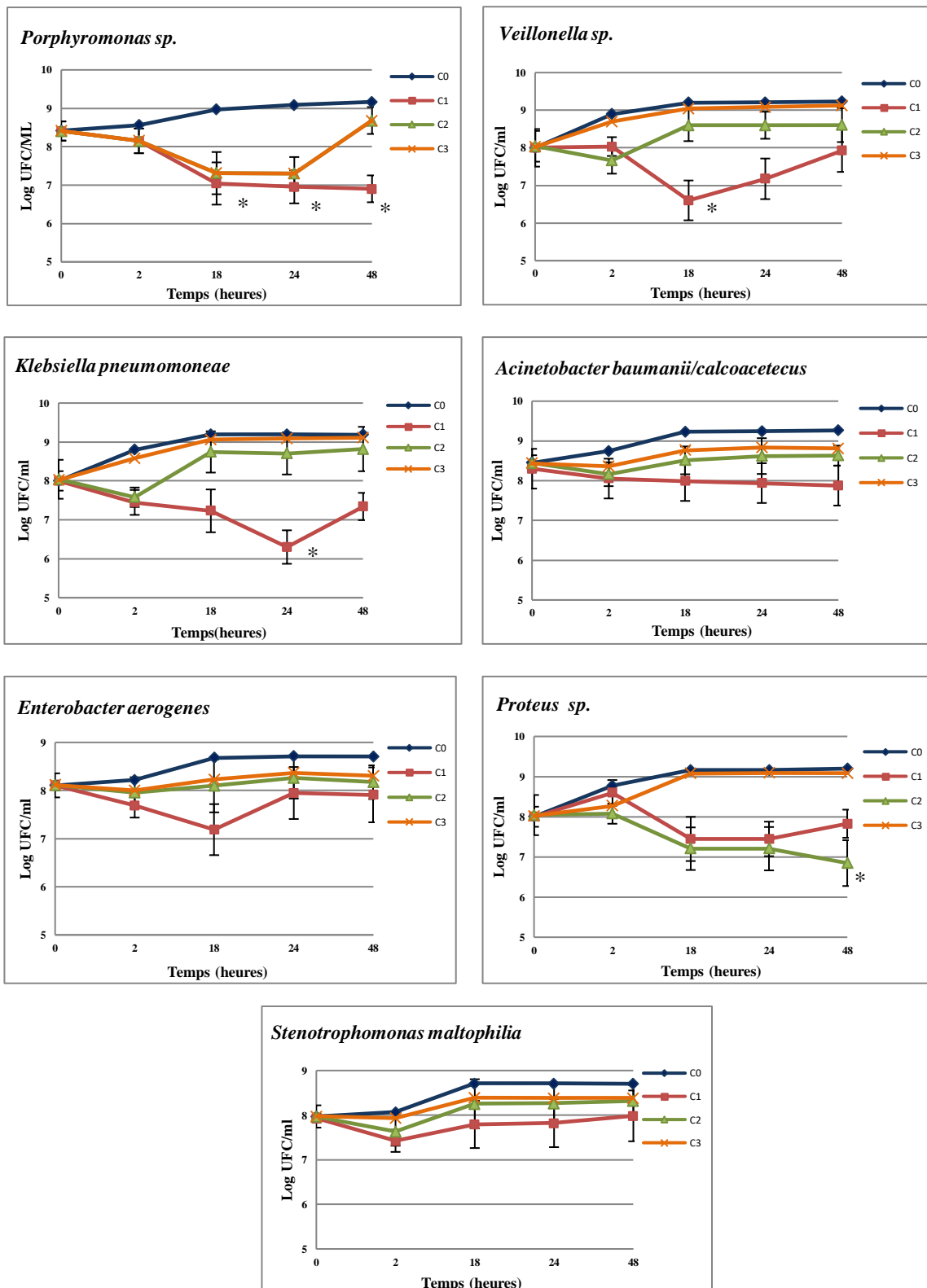
b) Activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'EM ont montré une activité antibactérienne modérée (CMB: 125000 μ g / ml) contre la plus part des microorganismes testés (figures n°43,44). *S. aureus* était la plus résistante alors que *Porphyromonas sp.* est la plus sensible à cet extrait (CMB: 31250 μ g / ml). La concentration 62500 μ g / ml de l'EM était plus active contre *Lactobacillus sp.* et *Proteus sp.* (CMB) pendant 24 et 48 heure d'incubation respectivement (*P \leq 0.05). Nos résultats ont révélé également l'activité bactéricide de l'extrait méthanolique (CMB: 125000 μ g / ml) contre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumomoneae*, *Acinetobacter baumannii/calcoacetecus* pendant 24 à 48 heure d'incubation et une diminution de l'activité bactéricide contre certaines souches a été enregistrée après 18 heure d'incubation.



C₀: Temoin; C₁:125000µg/ml ; C₂:62500µg/ml ; C₃:31250µg/ml

Figure n°43: Effet l'extrait methanolique de la graine de *N. sativa* sur la croissance des bacteries pathogenes à Gram positif (*P≤0.05)

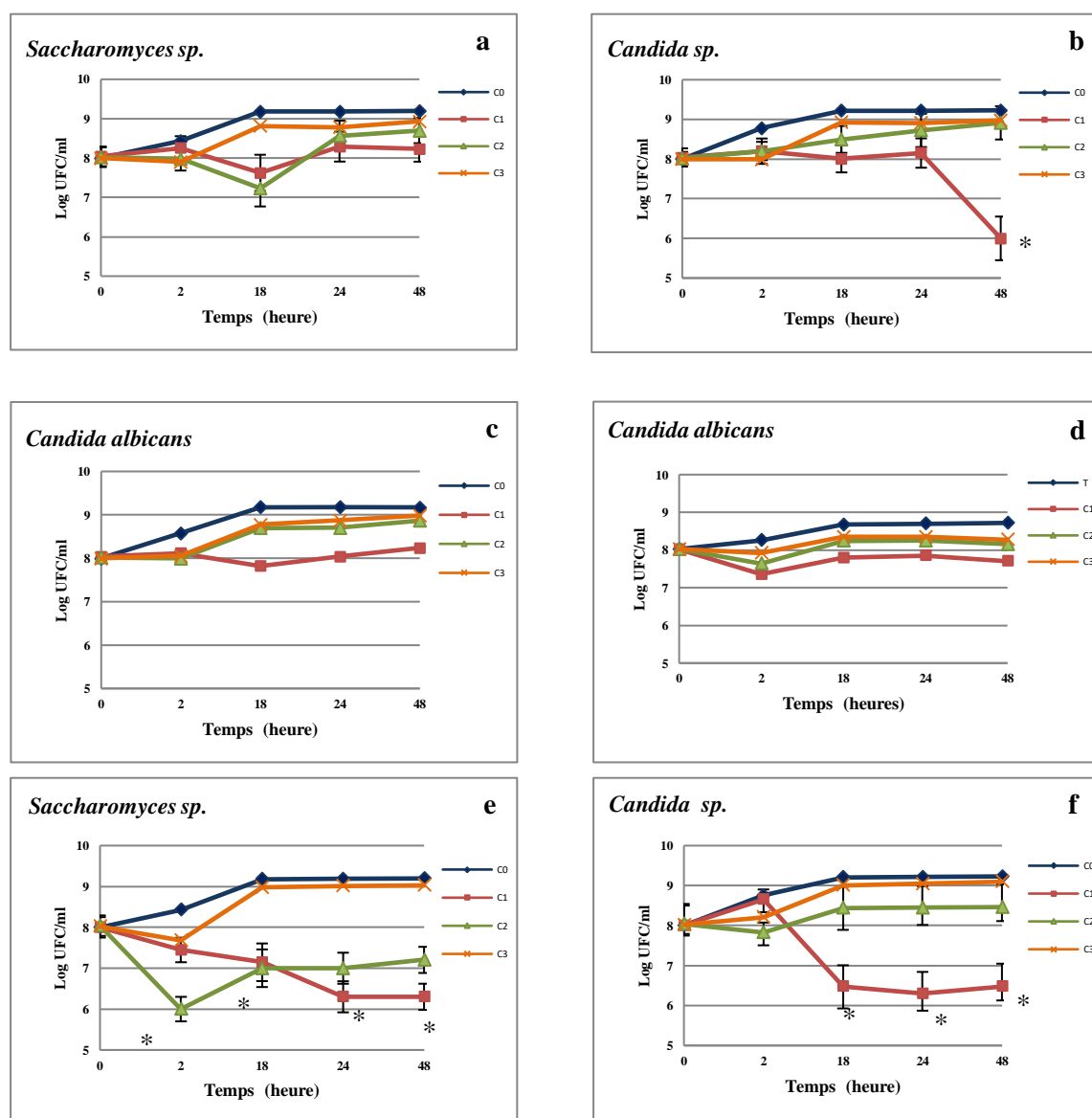


C₀: Temoin; C₁:125000µg/ml ; C₂:62500µg/ml ; C₃:31250µg/ml

Figure n°44: Effet l'extrait methanolique de la graine de *N. sativa* sur la croissance des bactéries pathogènes à Gram négatif (*P<0.05)

c) Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique sur les levures microscopiques

Selon les résultats obtenus (figure n°45), *Saccharomyces sp.* est la plus sensible aux extraits de la graine *N. sativa* dont la CMF de l'HE et d'EM est de 8250µg/ml et 62500µg/ml respectivement alors que l'efficacité fongicide des fortes concentrations (16500µg/ml de l'HE et 125000µg/ml d'EM) était hautement significative contre *Candida sp.* sur une période de 48 heures d'incubation.



HE: C₀: Temoin ; C₁:16500µg/ml ; C₂:8250µg/ml ; C₃:4125µg/ml

EM : C₀:Temoin ; C₁:125000µg/ml ; C₂:62500µg/ml ; C₃:31250µg/ml

Figure n°45: Effet de l'huile essentielle (a,b,c) et de l'extrait methanolique (d,e,f) de la graine de *N. sativa* sur la croissance de *C. albicans*, *Candida sp.* et *Saccharomyces sp.* (*P≤0.05)

II.10.2.2. Méthode de diffusion sur agar

D’après nos résultats, les souches pathogènes isolées de la cavité buccale des malades parodontaux ont représenté une forte résistance aux extraits de la graine *N. sativa* et avec les faibles zones d’inhibitions obtenues par la méthode des puits (ZI≤11mm), on note que l’efficacité antimicrobienne de nos extraits n’était pas clairement visible et ne reflète pas la sensibilité remarquable des souches testées obtenue par la méthode de microdillution.

Les résultats de cette méthode ont révélé que l’HE (16500µg/ml) est plus active contre *Saccharomyces sp.* et *Proteus sp.*, par rapport aux autres souches testées, avec des ZI de 7 et 8 mm respectivement tandis que *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* sont les plus sensibles à l’EM (125000µg/ml) avec des zones d’inhibition varie entre 5-11 mm (figure n°46).

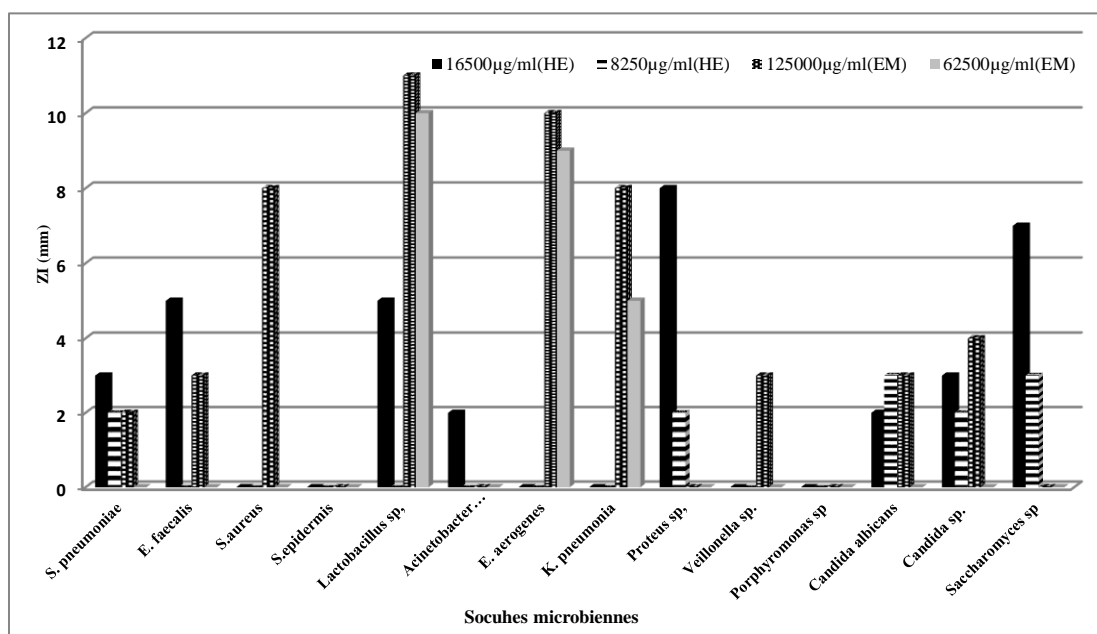


Figure n°46: Résultats d’activité antimicrobienne de l’huile essentielle et l’extrait méthanolique de la graine *N. sativa* (méthode de diffusion sur agar)

Nos résultats ont confirmé les travaux pareils de Shohayeb et Halawani, (2012) qui ont travaillé par la méthode des puits avec l’utilisation de DMSO comme diluant et un inoculum de 10⁷UFC/ml. Ce groupe de recherche montre que *P. aeruginosa* est la bactérie à Gram négatif la plus sensible à l’HE de la graine *N. sativa* (ZI 12mm) tandis que *K. pneumoniae* est la plus résistante (ZI 6mm) alors que la CMB obtenu par microdillution est de l’ordre de 4000 et 8000µg/ml pour la plupart des bactéries à Gram négatif testées.

En parallèle, les résultats des tests positifs (antibiogramme) sur certaines souches pathogène isolées de la cavité buccale des malade parodontaux ont révélé une résistance remarquable de *Klebsiella pneumonia*, *Veillonella* aux antibiotiques testés (ZI<8mm) avec une exception est enregistrée pour l'antibiotique ATM, ceci révèle la multirésistance de ces souches testées. Par ce test on a révélé la forte sensibilité des *Ecoli* et *Proteus sp.* à Penicilline et l'activité inhibitrice de spiramycine (100µg) contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Streptococcus pneumoniae* avec des zones d'inhibition de l'ordre de 20mm (figure n°47). Les résultats de l'antibiogramme ont confirmé également la forte résistance des coques à Gram positif au l'antibiotique ATM (ZI<8mm) et les bacilles à Gram négatif au Cefazoline par rapport aux autres bactéries testées.

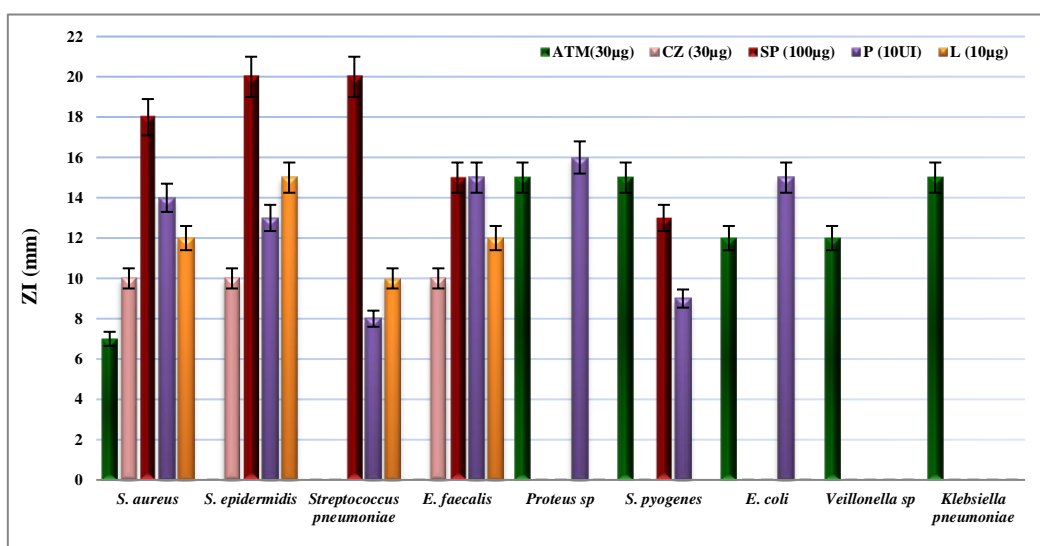


Figure n°47: Résultats de l'antibiogramme de certaines souches bactériennes pathogènes de la cavité buccale des malades parodontaux

Des nombreuses études ont montré l'efficacité *in vitro* de l'HE et d'EM des graines *N. sativa* (Shohayeb et Halawani, 2012; Jrah Harzallah et al., 2011; Suthar et al., 2010; Abu-Al-Basal, 2009; Salman et al., 2009; Salman et al., 2008; Singh et al., 2005; Kökdil et al., 2005 ; Singh et al., 2005; Ara et al., 2005; Ferdous et al., 1992) mais les résultats de CMI, CMB et ZI) étaient différents d'une étude à une autre selon le choix des souches testés (résistance ou la sensibilité des microorganismes), la méthode d'extraction de l'EM et l'HE, la nature du diluant ou la méthode utilisée (macrodilution, microdilution, diffusion sur milieu gélosé), la

concentration et/ou la quantité de extraits incluse dans les puits et la concentration de l'inoculum et encore l'origine de graines.

Dans notre étude, on a rapporté les propriétés antimicrobiennes *in vitro* de l'HE et de l'EM de la graine *N. sativa* du Sahara Algérien contre les micro-organismes pathogènes isolés de la cavité buccale des malades parodontaux par deux méthodes différentes.

La méthode de microdillution a révélé une excellente activité antimicrobienne de l'HE (CMB: 16500µg / ml) et une efficacité modérée de l'EM (CMB: 125000µg/ml) contre tous les microorganismes testés.

Nos résultats ont confirmé l'efficacité de l'HE contre les bactéries cariogènes et d'autres souches bactériennes à Gram positif (Jrah Harzallah et *al.*, 2011, Ara et *al.*, 2005). Cependant, des nombreuses études ont montré la résistance des bactéries à Gram négatif aux huiles essentielles (Ali et Blunden, 2003; Toama et *al.*, 1974) alors que nos résultats ont confirmé l'activité des huiles volatiles de la graine Algérienne *N. sativa* contre des nombreuses souches de ce groupe bactérien (Ara et *al.*, 2005).

D'autre part, on a révélé l'activité antimicrobienne spécifique de l'EM contre la plus parts des souches testées, cette efficacité a été confirmée dans nombreux travaux (Salman et *al.*, 2016; Tanis et *al.*, 2009; Aljabre et *al.*, 2005; Kökdil et *al.*, 2005).

Les résultats obtenus par la micodillution reflètent l'influence du temps d'incubation, la concentration des extraits et l'espèce microbienne testée sur l'efficacité de nos extraits et le suivie de la cinétique microbienne révèle la diminution de l'activité bactéricide des extraits de la graine *N. sativa* contre certains microorganismes et les souches ont repris leur croissance après 18 à 24h d'incubation. Ce phénomène pourrait être attribué à la diminution de la concentration des substances actives dans le milieu de culture ou peut être lié au changement des conditions physico-chimiques de milieu de culture qui peut altérer l'efficacité de ces substances actives contre les micro-organismes.

Les résultats d'analyse de l'HE de la graine *N. sativa* par la CPG-SM ont confirmé sa richesse en thymoquinone (72,4973%). D'autres composés volatils ont été caractérisés (p-cymène, carvacrol, 2,3-dihydrofarnesyl acétate, 4-Terpinenol ect), ces molécules ayant

des propriétés bactéricides et bactériostatique contre différentes souches microbiennes (Salman *et al.*, 2016; Halawani, 2009; Zhiri, 2006).

Scandorieiro *et al.* (2016), ont suggéré que des composés hydrophobes bioactifs endommagent la membrane cellulaire, augmentent la perméabilité cellulaire et affectent la synthèse des biomolécules et selon Zhiri (2006), ces activités dépendent de la composition chimique, des groupes fonctionnels (alcools, phénols, cétones et composés terpéniques) et des effets synergiques des principaux composés.

Selon notre étude, la CCM a détectée la présence de certaines molécules phénolique dans les deux extraits alors que les spectres de IRTF ont révélé la présence des groupements fonctionnels tel que les alcools, phénols et cétones et les chromatogrammes d'UPLC-SM indiquent la présence des polyphénols et flavonoïdes en extrait méthanolique et notre analyse quantitatifs a confirmé également la richesse de l'EM et l'HE de la graine *N. sativa* en polyphénols totaux et flavonoïdes. Généralement, toutes ces molécules possèdent des propriétés antimicrobiennes et thérapeutiques.

Topozada *et al.* (1965), ont rapporté l'activité antimicrobienne des composés phénoliques des graines *N. sativa* qui peuvent inhibés la synthèse des protéines (Mason et Wasserman, 1987) et selon Sato et ses collaborateur (1995), les flavonoïdes ont la capacité de complexé (séquestrer) les substrats de la croissance microbienne ou intervenant en chélation de métaux tels que le fer. Ces molécules peuvent également formées des complexes avec des protéines solubles extracellulaires et les parois bactériennes (Tsuchiya *et al.*, 1996).

Selon Stern *et al.*(1996), les quinones ont la capacité de formation d'un complexe irréversible avec les acides aminés des protéines, entraînant l'inactivation des protéines et la destruction de leurs fonctions.

Une étude de Salman et ses collaborateurs (2016), a rapporté la possibilité d'extraction des thymoquinones et les tanins de l'EM. Ces molécules naturelles possèdent également une activité antimicrobienne (Hashem et El-Kiey, 1982; Toama *et al.*, 1974).

Selon nos résultats, les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes en EM sont plus élevés par rapport à l'HE, mais cette dernière avait un effet antimicrobien plus fort (CMB de

16000µg / ml), qui pourrait être expliqué par la différence entre les principes actifs de l'HE et de l'EM et confirme l'activité antimicrobienne de la fraction non polaire des extraits de *N. sativa*. De plus, tous les résultats de la cinétique microbienne indiquent des actions bactéricides des deux extraits.

D'autre part, les résultats de la méthode de diffusion sur Agar (méthode des puits) n'ont pas reflété l'efficacité des extraits de la graine *N. sativa* contre les microorganismes testés. Selon Mahmoudi et *al.* (2016) et Salem et *al.* (2013b), les valeurs de la zone d'inhibition (ZI) sont potentiellement affectées par la solubilité de l'huile, la gamme de diffusion dans l'agar et l'évaporation. De plus, ils ont montré que les souches les plus sensibles (valeurs CMI inférieures) n'ont pas toujours les plus grandes zones d'inhibitions (méthode de diffusion) car le diamètre des zones d'inhibitions ne reflètent pas l'activité antibactérienne d'un composé.

II.11. Résultats de formulation des émulsions à base des extraits de la graine *N. sativa* et tween 80

Tween 80 est largement utilisé en domaine pharmaceutique comme émulsifiant pour construire des émulsions d'huile en eau (Mahdi et *al.*, 2011; Atba, 2008) mais ne doit pas dépassé 15 % lorsqu'il est utilisé seul (Atba, 2008), en parallèle plusieurs travaux ont étudié la préparation des émulsions mais certaines seulement parmi lesquels sont intéressés par les huiles de *N. sativa* comme une phase dispersée.

Selon nos résultats, 1.25% et 0.4% en tween 80 sont les proportions idéales pour la préparation des émulsions stable de l'HE (1.65%) et d'EM (6.25%) successivement (annexe V). Selon Shaaban et *al.* (2015), 5% de Tween 20 est suffisante pour la formulation des microémulsions à base de l'eau et d'HE (1.4%) de la graine *N. sativa* dans les conditions fixées alors que la formulation de microémulsion de l'huile par l'utilisation des surfactants combinés d'HLB 16 (60% Tween 20 et 40% Tween 80) a produit avec succès une émulsion transparente (Mohamed et *al.*2014).

II.12. Etude de stabilité des émulsions à base des extraits de la graine *N. sativa***II.12.1. Résistance des émulsions**

Il y a eu une stabilité totale des émulsions d'HE et d'EM pendant 30 mn de centrifugation et même durant 60 jours de conservation à différentes températures, aucun phénomène d'instabilité physique (sédimentation et crémage, floculation) n'est observé (pas de changement dans l'apparence). Selon Atba (2008), l'addition des émulsionnants ou d'autres stabilisants peut minimiser les formes d'instabilités avec un minimum de viscosité, un maximum de stabilité au stockage à la chaleur, au froid et une bonne résistance à la centrifugation.

II.12.2. Observation microscopique des émulsions

Selon l'observation microscopique des émulsions et le traitement des images obtenues par un logiciel Mésurim, il apparaît que les diamètres des émulsions des HE et EM sont successivement de l'ordre de $0,99 \cdot 10^2 \text{ nm} \pm 50$ et de $1,19 \cdot 10^2 \pm 28 \text{ nm}$ à t_0 . Après 60 jours, nous avons estimé la moyenne des diamètres des émulsions HE et EM conservées à différentes températures (4°C, 20°C et 40°C) à environ $1,09 \cdot 10^2 \pm 0,6$ et $1,4 \cdot 10^2 \pm 0,4 \text{ nm}$ successivement, ce qui confirme leur stabilité microscopique à différentes températures (figure n° 48).

Ces émulsions ont été identifiées autant que des Nanoémulsions (*NEs*) qui font partie des émulsions submicroniques (miniémulsions ou émulsions ultrafines) (Ali, 2016; Mundada et al., 2016) dont le diamètre des gouttelettes est comprise entre 1 et 1000 nm mais les *NEs* correspondant aux tailles les plus faibles de cette famille d'émulsions (Ali, 2016). Cependant, il n'y a pas encore de consensus dans la littérature pour définir précisément la gamme de diamètre des *NEs*, elle est inférieure à 200 nm ou de 5 à 200 nm (Ali, 2016), allant de 10 à 500 nm (Mundada et al., 2016) ou entre 20 à 200 nm (Jaiswal et al., 2015).

Les émulsions submicroniques sont de plus en plus intéressantes en médecine à raison de leur stabilité cinétique, de leur grande capacité de solubilisation et de leur taille infime en globules (Mundada et *al.*, 2016). D'autre part et en comparaison avec les travaux de Shaaban et *al.*, (2015), le diamètre de l'émulsions à base de l'HE de la graine *N. sativa* (1%) et tween 20 (5%) est de l'ordre de $8.7 \pm 0.1 \text{ nm}$.

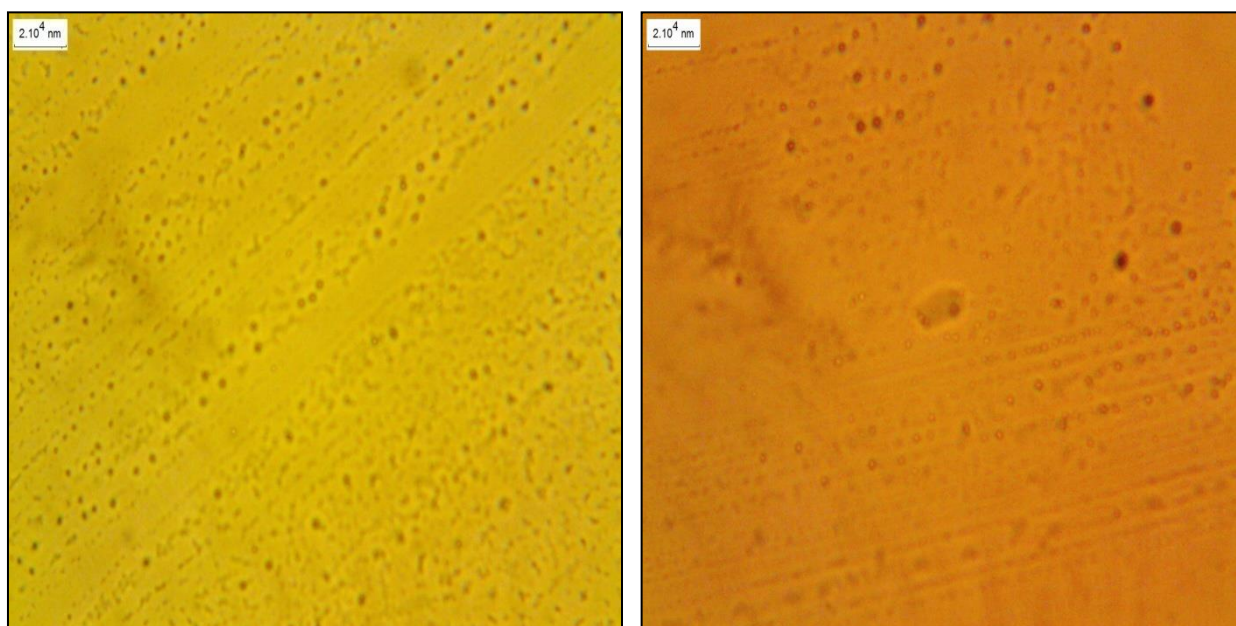


Figure n°48: Observation microscopique des *NEsHE* (a) et *NEsEM* (b) (G40X)

II.12.3. Etude de stabilité physicochimique et biochimique des nanoémulsions de *N. sativa*

II.12.3.1. Effet de température et durée de la conservation sur le pH des nanoémulsions de *N. sativa*

Dans les études des systèmes dispersés, toute modification du milieu se traduit par un changement du pH (Atba, 2008). D'après nos résultats, on a constaté une forte stabilité de pH de *NEsHE* ($P > 0.05$) durant 60 jours de conservation cela est due à la stabilité chimique de la préparation. Au bout de la même période, il apparaît l'influence du temps sur le pH des *NEsEM* ($P < 0.001$) et en parallèle, on a enregistré une stabilité totale de pH de l'ED ($P > 0.05$) (figure n°49). Selon Atba (2008), l'instabilité de pH peut être à l'origine de chute ou d'augmentation de la viscosité du milieu.

Vaca Medina (2010), a rapporté que des changements importants en température peuvent également avoir des fortes influences sur la stabilité d'une émulsion par une modification de la solubilité d'agent émulsifiant, dégradation ou modification de conformation alors que ces phénomènes n'étaient pas clairement visibles pendant la conservation des *NEsHE* et *NEsEM* à différentes températures ($P>0.05$).

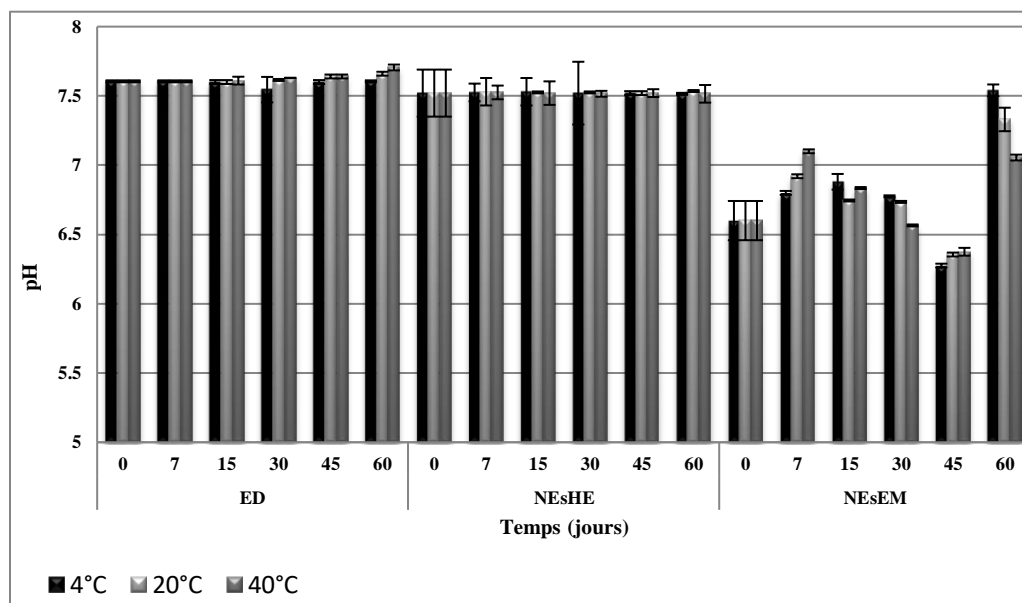


Figure n°49: Effet de la température de conservation sur la stabilité de pH des *NEsHE* et *NEsEM*

II.12.3.2. Effet de température et durée de la conservation sur la conductivité électrique des nanoémulsions de *N. sativa*

Les mesures de la conductivité électrique sont très utiles pour déterminer la nature de la phase continue et détecter les phénomènes d'inversion de phase. (Gurpreet et Singh, 2018). Nos résultats montrent une forte conductivité des nanoémulsions H/E qui est assurée avec de l'eau en phase externe qui conduit le courant entre les électrodes (Gurpreet et Singh, 2018; Jaiswal et al., 2015), d'autre part aucune variation significative de la conductivité pouvant être attribuée à une inversion de phase est enregistré pendant 60 jours de conservation ($P>0.05$) alors que l'effet de la température était clairement visible sur les *NEsEM* ($P<0.001$) par rapport aux *NEsHE* ($P<0.01$) (figure n°50).

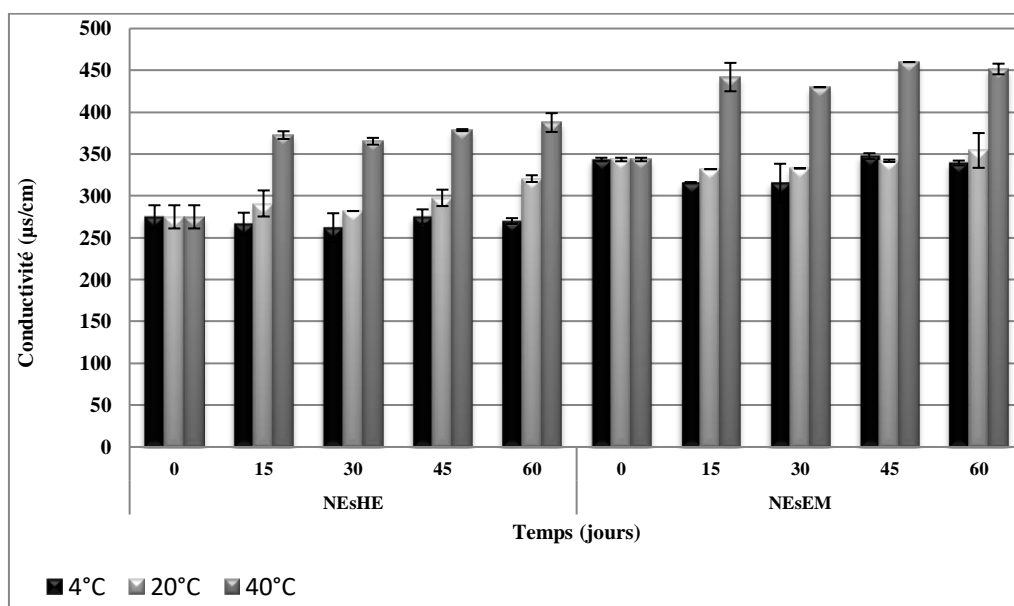


Figure n°50: Effet de la température de conservation sur la stabilité de la conductivité électrique des *NEsHE* et *NEsEM*

II.12.3.3. Effet de température et durée de la conservation sur la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des nanoémulsions de *N. sativa*

Les analyses de la variance des *NEsHE* rapportent une stabilité des teneurs en polyphénols et flavonoïdes ($P > 0.05$) pendant 60 jours (figures n°51,52) alors que leur conservation à différentes températures s'accompagne des pertes significatives en polyphénols ($P \leq 0.05$) et d'autres hautement significative ($P \leq 0.01$) en flavonoïdes, ces pertes étaient plus importantes lors de la conservation à 40°C alors que des diminutions remarquables sont survenues en polyphénols et flavonoïdes des *NEsEM* pendant la même période ($P < 0.001$) sans influence significative de la température de conservation sur leur stabilité ($P > 0.05$).

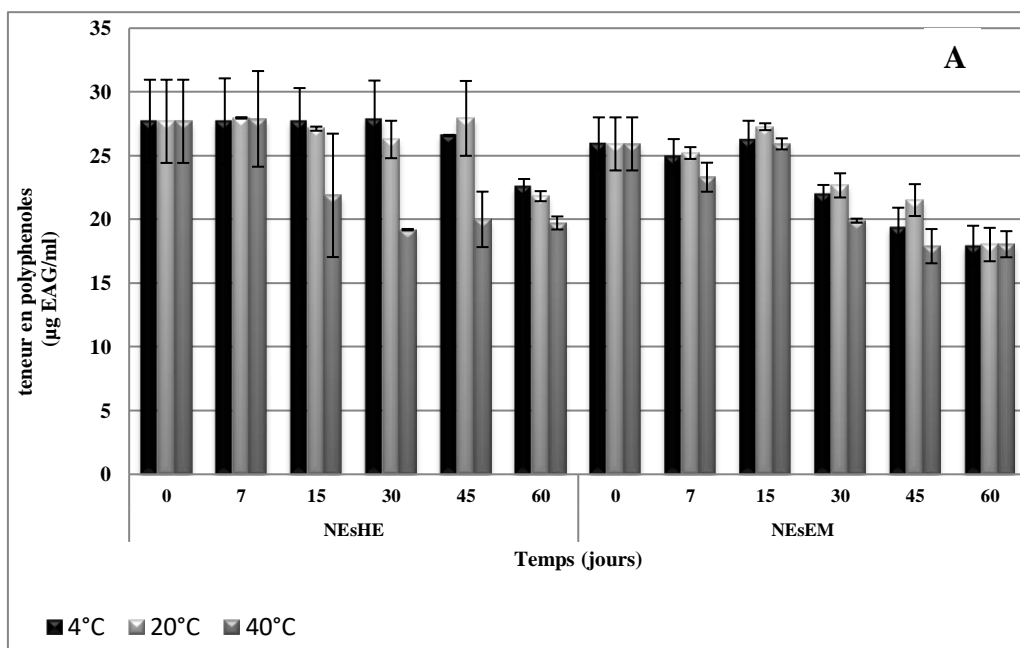


Figure n°51: Effet de la température de conservation sur la stabilité des polyphénols totaux des *NEsHE* et *NEsEM*

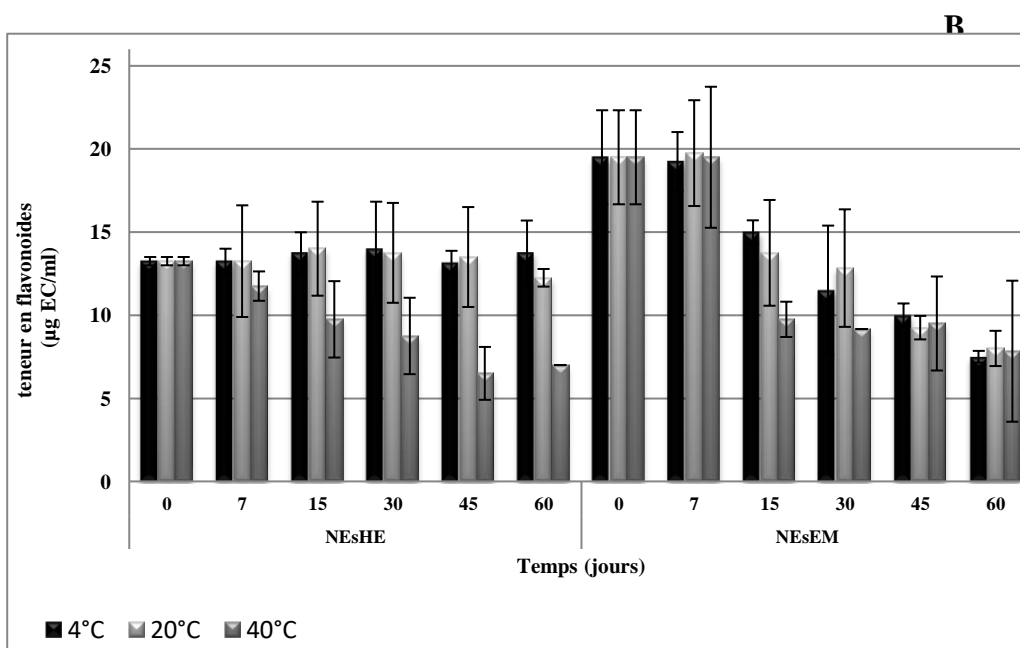


Figure n°52: Effet de la température de conservation sur la stabilité des flavonoïdes des *NEsHE* et *NEsEM*

II.12.4. Analyse de la stabilité des nanoémulsions de la graine *N. sativa* par spectrophotométrie UV-visible

Cette technique est appliquée pour détecter les changements survenus sur les *NEsHE* et *NEsEM* durant la conservation à différentes températures. Selon les résultats obtenus, en domaine visible (400-800nm), l'absorbance était très faible, dans certains cas, les valeurs sont nulle ou proche de nulle ce qui reflète la transparence ou semi transparence des *NEs* (annexe V). Selon Pierat (2010), les *NEs* sont transparentes ou translucides à l'œil et sont stables à la sédimentation ou au crémage. Dans l'intervalle UV (200-400), l'absorbance était plus élevée ce qui reflète que les *NEs* comportent des molécules dont l'absorbance est maximale entre 200-280nm (figures n°53,54).

Farag et al.(2014), ont confirmé, par UPLC-SM, la présence de plusieurs molécules (acides phénoliques, des alcaloïdes, flavonoïdes et phénols) en extraits méthanoliques de la graine *N. sativa* dont les longueurs d'ondes de détection étaient comprises entre 260 à 353 nm et d'après les travaux de Peter Wuelfing et ses collaborateurs (2006), le polysorbate 80 possède également une forte capacité d'absorbance sur une plage de 200 à 300 nm dans des solutions pertinentes pour l'analyse de dissolution ce qui provoque généralement une interférence avec des composés actifs d'intérêt pharmaceutique, car ces molécules organiques contiennent souvent des chromophores $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ ou $\sigma \rightarrow \pi^*$ (les transitions électroniques ont généralement lieu à $\lambda \leq 300$ nm).

D'autre part on a enregistré une stabilité remarquable de *NEsEM* conservées à différentes températures alors que les *NEsHE* étaient plus stables à +4°C avec une influence remarquable de +40°C.

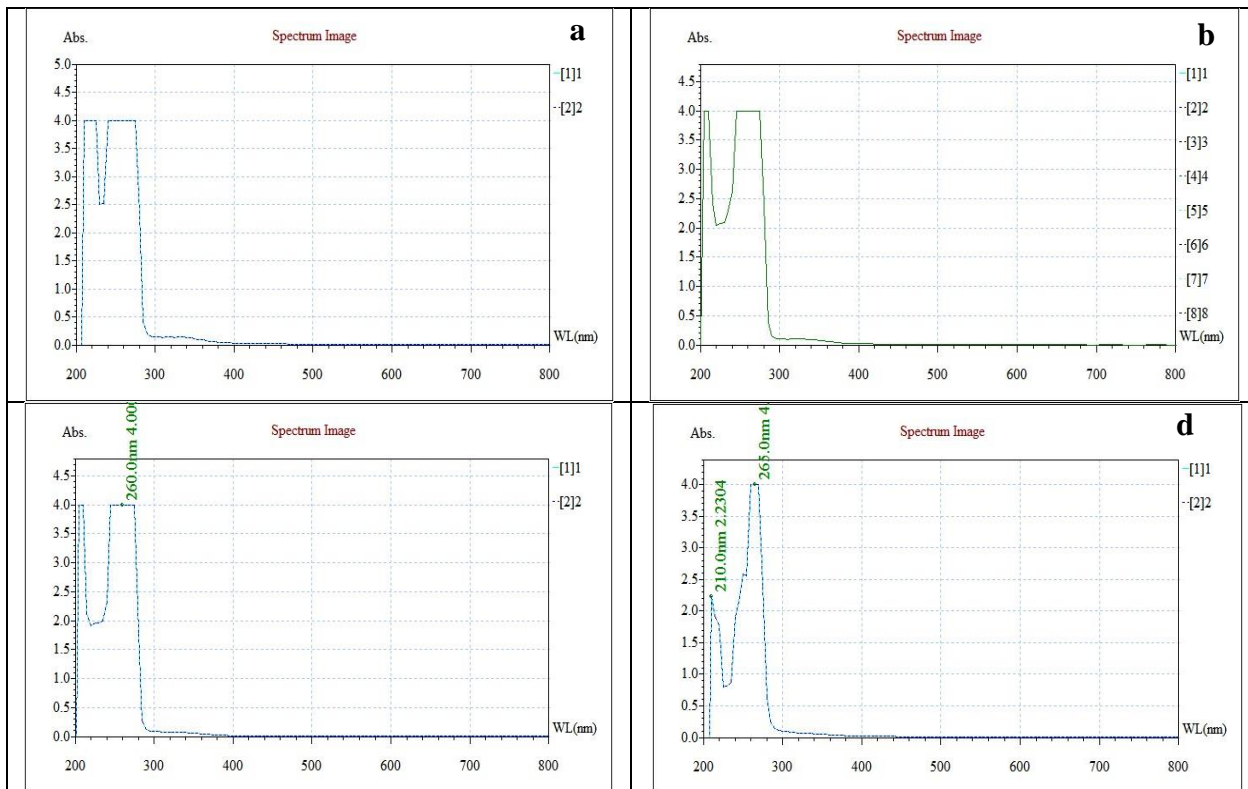


Figure n°53: Analyse de stabilité des NESHE de *N. sativa* par spectrophotométrie UV-visible (a: 0jr; b: 60jr à 4°C; c: 60jr à 20°C; d: 60jr à 40°C)

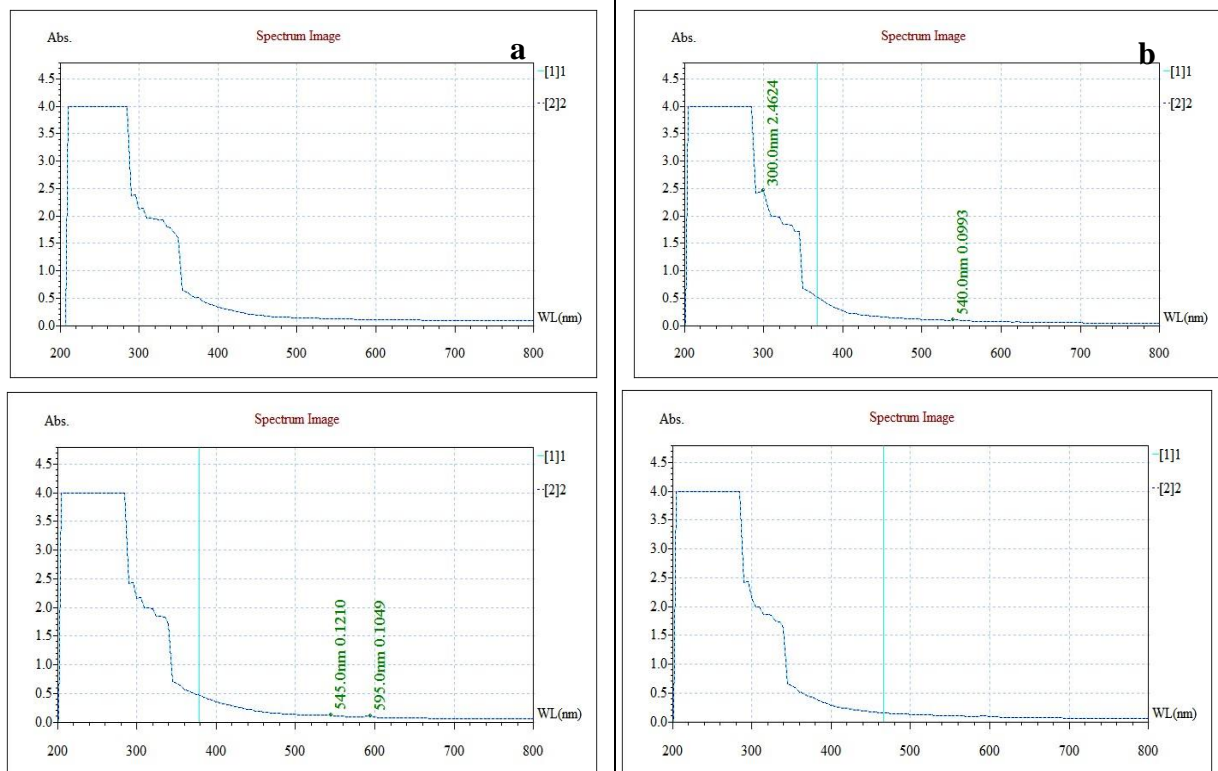


Figure n°54: Analyse de stabilité des NESem de la graine *N. sativa* par spectrophotométrie UV-visible (a: 0jr; b: 60jr à 4°C; c: 60jr à 20°C; d: 60jr à 40°C)

II.12.5. Effet de température et durée de la conservation sur la stabilité microbiologique des nanoémulsions de la graine *N. sativa*

Nos résultats illustrés dans les figures 55, 56, ne montrent aucune différence statistique significative entre les *NEsHE* conservées à différente température ($P > 0.05$), en parallèle, une réduction de la charge microbienne (germe totaux et champignons microscopiques) a été enregistrée pendant la conservation ($P < 0.05$). Les résultats microbiologiques des *NEsEM* montrent une augmentation des nombres des germes totaux pendant les premiers 30 jours et une diminution pour tous les germes après 60 jours ($P < 0.001$) avec une légère augmentation des nombres des levures et moisissures ($P > 0.05$) alors que l'effet des températures de conservation était clairement visible sur les levures et moisissures ($P < 0.001$) par rapport aux germes totaux ($P > 0.05$). Les résultats des *NEsEM* peuvent être justifiés par la probabilité de germination de certains germes sporulés pendant la conservation des *NEsEM*. On note qu'on a enregistré une stabilité microbiologique totale de l'ED ($P > 0.05$) dans les mêmes conditions expérimentales.

Selon Saleh AI-Jassir (1992), le nombre des bactéries aérobies totales et des levures-moisissures de la graine *N. sativa* est de l'ordre de 7.10^7 UFC/g et 4.10^2 UFC/g successivement tandis que le nombre des aérobies sporogène était autour de 4.10^4 avec un faible nombre des *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

D'un autre côté, on note que la pharmacopée européenne a fixé le nombre des germes totaux et des levures-moisissures dans les préparations aqueuses non stérile autour de 10^2 et 10^1 UFC/ml successivement et sont de l'ordre de 10^4 et 10^2 UFC/ml successivement dans les préparations pharmaceutiques non stériles pour l'administration par voie orale contenant des matières premières d'origine naturelle (AFSSAPS, 2009). Nos résultats confirment la forte qualité et l'excellente stabilité microbiologique des *NEs* préparées qui n'a pas dépassé 35 UFC/ml des germes totaux et 10 UFC/ml des levures et moisissures dès le premier jour jusqu'à le dernier jour de conservation à différentes températures.

Les résultats de recherche des germes pathogènes ont révélé leurs absences totales dans les deux formulations. Ceci reflète l'efficacité conservatrice des substances bioactives de nos extraits (annexe V).

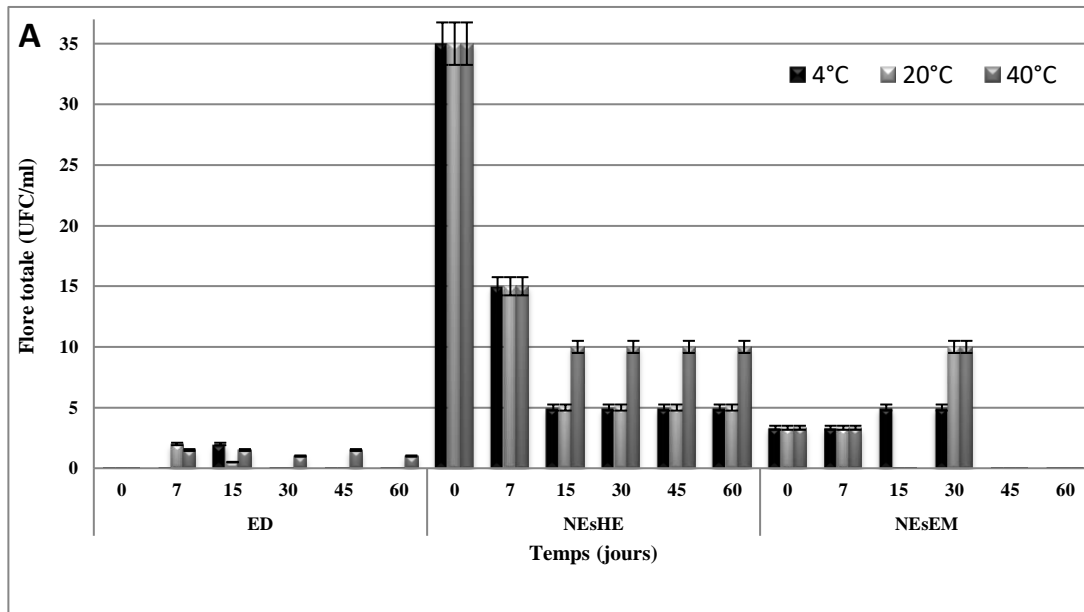


Figure n°55: Résultats de dénombrement de la flore totale des *NEsHE* et *NEsEM*

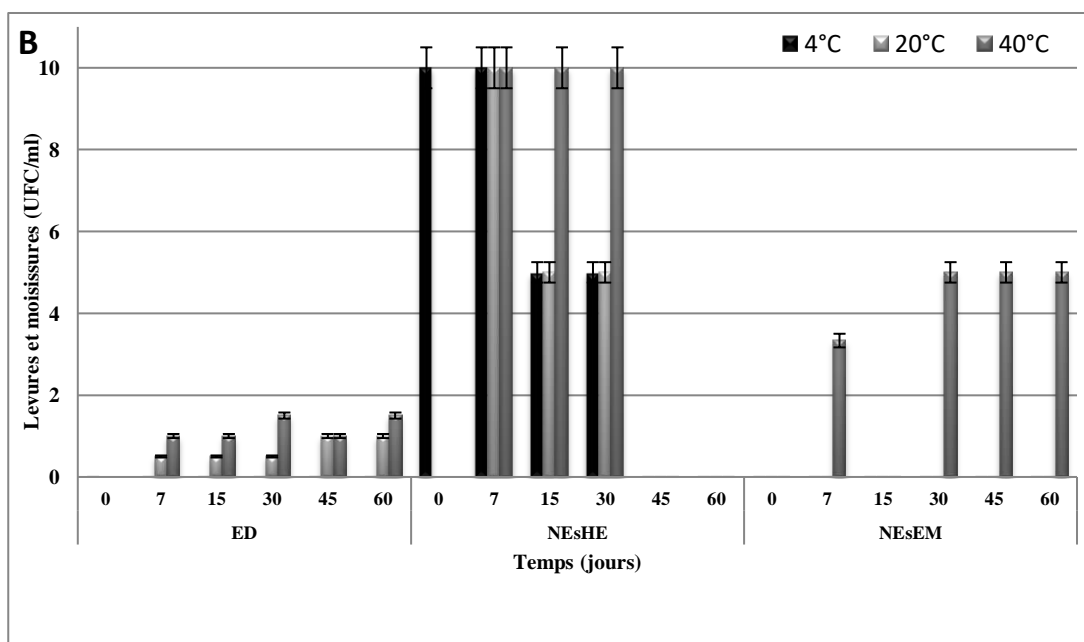


Figure n°56: Résultats de dénombrement des levures et moisissures des *NEsHE* et *NEsEM*

II.12.6. Etude de l'effet de température et durée de la conservation sur la stabilité macroscopique des émulsions

Les observations macroscopiques des *NEs* de la graine *N. sativa* ont confirmé la stabilité physicochimique, microbiologique et microscopique durant 60 jours. On a montré également l'efficacité conservatrice des substances bioactives de nos extraits à 4°C et 20°C par rapport à 40°C qui peut affecter la stabilité de certains paramètres testés, mais cette influence n'a pas altérée ni la transparence ou l'aspect microscopique des *NEs*.

Selon Gurpreet et Singh (2018), les *NEs* sont des systèmes thermodynamiquement stables, composés de deux liquides non miscibles mélangés à des agents émulsifiants (tensioactifs et co-tensioactifs).

II.12.7. Résultats d'application *in vivo* des *NEsHE*

II.12.7.1. pH salivaire

Par rapport au test placebo, les résultats de pH salivaire ont révélé une diminution après le traitement par *NEsHE* (figure n°57) sans danger d'érosion de l'émail qui ne se produit qu'à partir d'un pH de 5,5. Ces résultats reflètent la capacité de notre formulation en neutralisation du pH salivaire.

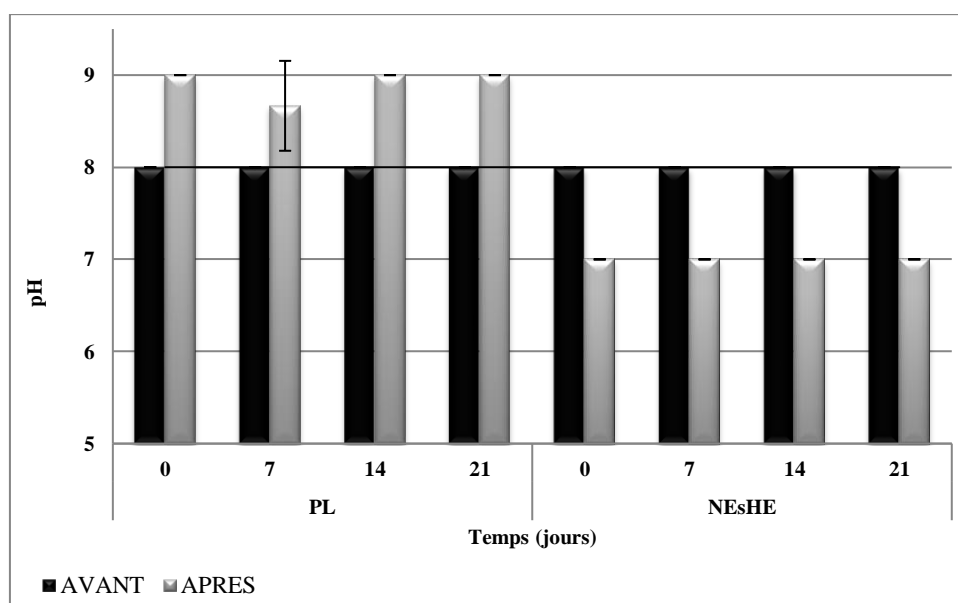
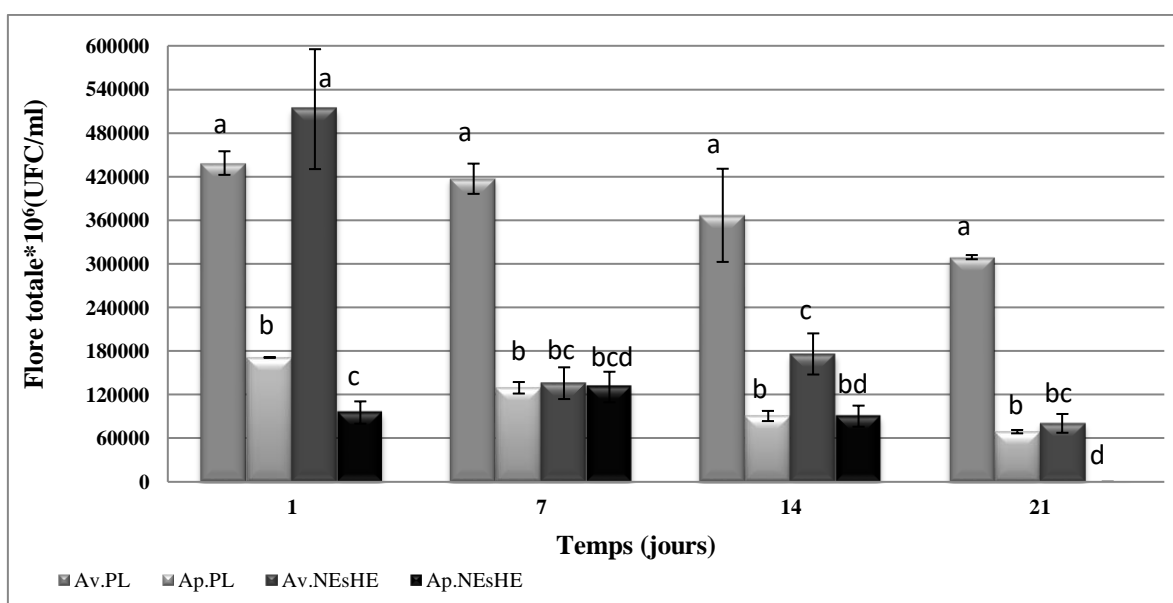


Figure n°57: Résultats de l'effet de *NEsHE* sur le pH salivaire (*in vivo*)

II.12.7.2. Effet *in vivo* des *NEsHE* sur la flore totale des gingivites

Plusieurs travaux scientifiques ont étudié l'efficacité thérapeutique des bains de bouche chimiques et d'autres à base des extraits naturels sur les pathologies buccodentaires. Des résultats variables ont été rapportés sur leur efficacité *in vitro* et d'autres *in vivo* par l'application des traitements au cours deux semaines à quatre mois. (Sobouti et al., 2018; Subramaniam et Gupta, 2013; Da Silva et al., 2012; Shetty et al., 2013; Nagappan et John, 2012; Shafiei et al., 2012; Palombo, 2011; Al-Bayat et al., 2010) mais aucune de ces études n'a été menée sur l'application *in vivo* des émulsions à base de l'HE de la graine *N. sativa* en traitement des maladies parodontales.

Dans notre étude, par une application thérapeutique des *NEsHE* de la graine *N. sativa* (conservé à 4°C) sur la plaque dentaire des gingivites et en comparaison avec le test Placebo, on a révélé l'effet inhibiteur hautement significatif de ce traitement contre la flore totale supragingivale ($P < 0.001$). Une réduction importante de la charge microbienne totale de plus de 10^{11} UFC/ml à 10^6 UFC/ml a été enregistrée pendant 21 jours de traitement (figure n°58; annexe VI) avec une stabilité des biofilms dentaires maturés des gingivites traitées par *NEsHE* vers 6×10^{10} UFC/ml ($P < 0.001$) par rapport aux malades qui ont utilisé le test placebo avec une stabilité des biofilms dentaires maturés de ce groupe autour 3×10^{11} UFC/ml après 21 jours.



Av.NEsHE: Avant le brossage et le rinçage avec nanoémulsions de l'huile essentielle; *Ap.NEsHE* : Avant le brossage et le rinçage avec nanoémulsions de l'huile essentielle; *Av.PL*: Avant le test placebo; *Ap.PL*: Après le test placebo.

Figure n°58: Effet (*in vivo*) de *NEsHE* de la graine *N. sativa* sur la flore orale des gingivites. Différentes lettres indique la différence significative ($p < 0.05$) dans le même groupe (test Student's)

L'étude de Chaieb et ses collaborateurs (2011), a confirmé l'efficacité inhibitrice *in vitro* de la molécule thymoquinone de l'HE de la graine *N. sativa* sur le biofilm des souches multirésistantes *E. Faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* et *P. aeruginosa* alors que Manju et al. (2016), ont rapporté que les nanoparticules de l'HE de la graine *N. sativa* inhibent, *in vitro*, l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm des *S.aureus* et *Vibrio harveyii*.

Shaaban et ses collaborateurs (2015), ont montré; dans une étude comparative entre les microémulsions de la graine *N. sativa*, eugénol (substance aromatique naturelle) et la solution de Ceftriaxone (antibiotique); l'efficacité remarquable *in vitro* des microémulsions des HE obtenus par l'hydrodistillation des huiles grasses de la graine *N. sativa* par rapport à la microémulsion d'eugénol contre certaines bactéries pathogènes avec une exception est enregistrée contre *P. aeruginosa* (méthode de diffusion sur un milieu gélosé).

Les résultats ultérieurs de Vlachojannis et ses collaborateurs (2018) ont confirmé *in vitro* l'efficacité des microémulsions aqueuse de *Nigella*, même à la plus faible concentration testée, contre 17 espèces salivaires humaine responsable de pathologies buccodentaires notamment les *S. aureus*, *Bacillus cereus* et *Salmonella typhimurium*,.

II.12.7.3. Effet des *NEsHE* (*in vivo*) sur les indices cliniques des gingivites

Selon nos résultats, le traitement par la *NEsHE* a révélé un impact positif sur certains indices cliniques testés des gingivites (figure n°59). Elle a eu des effets statistiquement très hautement significatifs ($P < 10^{-6}$) sur l'indice de plaque (IPI), l'indice gingival (IG) et l'indice d'hygiène orale (IHO) après 21 jours de traitement par *NEsHE* par rapport au test placebo (*PL*) pendant la même durée.

En comparaison entre les groupes de *PL* et *NEsHE*; une différence très hautement significative de IPI ($P < 0,001$) et autre significatives de IHO ($P < 0,05$) est apparue après 7 jours alors que cette différence n'était clairement visible qu'après 14 jours en cas de IG ($P < 0,001$). Ces résultats reflètent l'efficacité remarquable de *NEsHE* sur la flore buccale des gingivites, ceci influe directement ou indirectement sur les indices mesurés.

D'autre part une stabilité importante en indice de tartre ($P > 0.05$) est dû, probablement, à la précipitation de protéines salivaires sur la surface de la dent, à l'épaisseur des pellicules et à la précipitation accrue ou dans la couche pelliculaire (Van Leeuwen et *al.*, 2011).

Selon Kukreja et Dodwad (2012), les bains de bouche naturels peuvent offrir des avantages significatifs par rapport aux produits chimiques alors que Van Leeuwen et ses

collaborateurs (2011), ont conclu que le bain de bouche à base de HE pourrait constituer une alternative fiable à la Chlorhexidine (CHX) pour la réduction de l'inflammation gingivale.

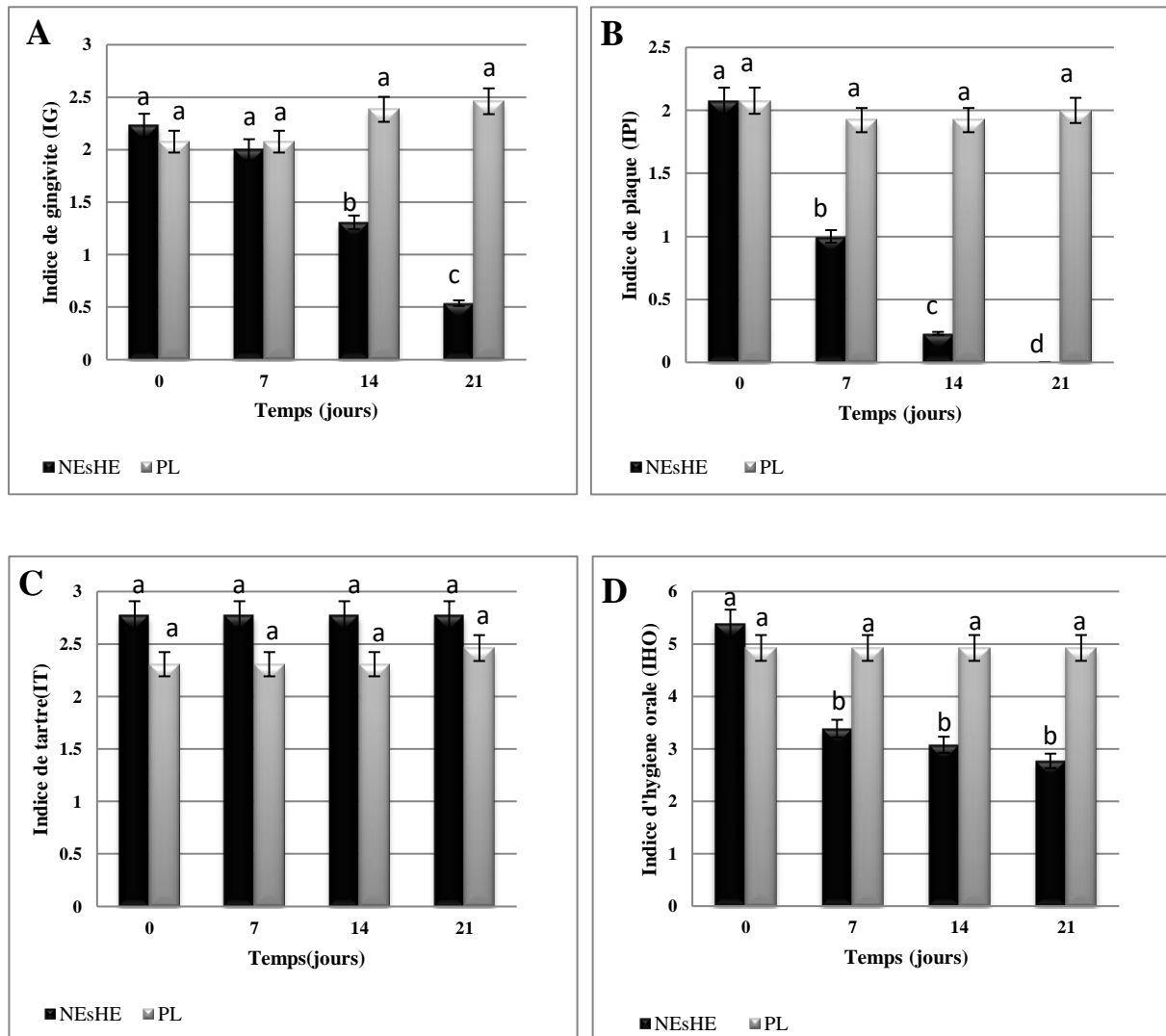


Figure n°59: Résultats de l'effet de NEsHE (in vivo) sur les indices cliniques des gingivites: indice de gingivite (A); indice de plaque (B); indice de tartre (C); Indice d'hygiène buccale (D). Des différentes lettres indiquent une différence significative dans le même groupe (test de Student).

En ce qui concerne les effets secondaires de NEsHE tels que les taches extrinsèques, altération de la sensation gustative et sensation de brûlure dans la bouche, notre enquête a confirmé qu'aucune de ces problèmes n'ont été rapportés par les patients traités. Par nos résultats on a confirmé que la coloration des dents n'est actuellement pas un effet secondaire reconnu des bains de bouche à base d'HE en traitement des gingivites (Van Leeuwen et al., 2011).

Des effets importants ont été découverts pendant 21 jours d'utilisation (*in vivo*) des *NEsHE* de la graine *N. sativa* en traitement des gingivites. L'impact est manifeste par une réduction remarquable de la charge microbienne et des améliorations importantes en différents indices cliniques ce qui reflète l'efficacité du traitement par rapport au test placebo.

Des nombreuses études (*in vitro* et *in vivo*) ont montré l'efficacité des extraits naturels, rince-bouche à base des plantes et des microémulsions contre les bactéries cariogènes et les bactéries associées aux pathologies buccodentaires (Vlachojannis et *al.*, 2018; Sobouti et *al.*, 2018; Costa et *al.*, 2014; Saeki et *al.*, 1989). Selon Sikkema et *al.* (1994), la solubilisation de l'HE dans les membranes provoque une déstabilisation de la structure et augmente la perméabilité membranaire et conduit à la mort cellulaire.

Dans un rapport détaillé, Palombo (2011), a démontré la capacité d'un extrait naturel en réduction de l'adhérence des agents pathogènes microbiens à la surface des dents, il inhibe la formation des biofilms dentaires.

Dans une autre étude, Niu et Gilbert (2004), ont montré que l'HE peut interagir avec des protéines de surfaces bactériennes et inhibe leur fixation et donc la formation de biofilm. En outre, elle peut pénétrer en profondeur dans le biofilm bactérien et participe à sa dislocation et en ralentissement de la croissance bactérienne avec une réduction de la maturation et pathogénicité de la plaque (Vervelle et *al.*, 2010).

L'étude menée par Vlachojannis et *al.* (2018), a confirmé également l'efficacité significative des microémulsions à base aqueuse de l'huile de la graine *N. sativa* (1.25–5 et plus de 10%) et de tween 80 (20%) sur les bactéries salivaires orales sans activité antimicrobienne remarquée du surfactant et ils ont rapporté que la thymoquinone et ses dérivés contribués également à l'activité antibactérienne de l'huile de *Nigella*.

Ainsi Shaaban et ses collaborateurs (2015), ont rapporté une forte activité antibactérienne (*in vitro*) et sélective des microémulsions de l'HE de la graine *N. sativa* par rapport au Ceftriaxone contre les bactéries buccales pathogènes. Elle résulte de la haute teneur en thymoquinone qu' a la capacité de modifier la résistance des bactéries aux antibiotiques en agissant en tant qu'inhibiteur de la pompe à efflux de la membrane cellulaire des bactéries, elle est de nature protéique extrudent les agents antimicrobiens à l'extérieur de la cellule.

Cependant Vervelle et ses collaborateurs (2010), ont ajouté que le mode d'activité des bains de bouche aux huiles essentielles dépend de la concentration de son principe actif, à forte concentration ils détruisent les membranes et les protéines bactériennes et à faible concentration, les bains de bouche inactivent les enzymes vitales des bactéries. En plus l'utilisation de ces préparations à long terme présente peu d'effets indésirables et ne semble pas induire une sélection bactérienne défavorable. Cependant, il ne fait aucun doute que les HE sont plus efficaces que leurs constituants marqueurs (Vlachojannis et *al.*, 2018; Vervelle et *al.*, 2010).

En plus on note que plusieurs études expérimentales ont prouvé l'efficacité et la sécurité sanitaire d'utilisation des huiles (volatiles et végétale) et les extraits de la graine *N. sativa* et de ses constituants grâce à leur légère toxicité (DL₅₀ élevée) et aucun changement pathologique remarquable n'a été enregistré pendant l'utilisation (Vlachojannis et *al.*, 2018; Tekbas et *al.*,2018; Amin et Hosseinzedah, 2015). D'autres travaux ont confirmé que l'huile de nigelle n'était pas associée à des effets cytotoxiques sur les fibroblastes gingivaux (Ugur et *al.*, 2016 dans Vlachojannis et *al.*,2018).

Tous les résultats de notre étude ont confirmé les travaux récents qui suggèrent la possibilité d'ajouter des huiles essentielles pour le maintien de l'hygiène buccale ou la prévention des maladies dentaires (Palombo, 2011) et devant tous ces donnés, nous rappelons qu'un brevet avait été déposé en 1989 à l'Office Européen des brevets (n°0341795A1) indiquant que la combinaison d'extraits de plantes entraînait une réduction synergique de la plaque dentaire et des hémorragies gingivales (Shetty et *al.*, 2013).



Conclusion générale



Conclusion et perspectives

Les maladies parodontales sont des pathologies buccodentaires multifactorielles, elles aboutissent à la destruction du parodonte, tissus incluant la gencive et les structures d'ancrage de la dent. Il est actuellement bien démontré que la flore microbienne joue un rôle déterminant dans l'apparition de ces lésions, notamment les microorganismes pathogènes (bactéries parodontopathogènes) contenus dans la plaque bactérienne dentaire.

L'évolution de ces pathologies passe par deux stades distincts: les gingivites, lésions confinées au rebord gingival et les parodontites, maladies destructrices des tissus de soutien de la dent (INSERM, 1999).

À l'état normal, on trouve une plaque bactérienne comprenant des coques et des bacilles à Gram positif. Si la plaque s'accumule au-delà de ce qui est accepté par les tissus gingivaux, le nombre et la distribution des microorganismes changent et facilitent l'installation des bacilles anaérobies à Gram négatif et des spirochètes. Avec l'augmentation de la résistance de la flore buccale aux agents antimicrobiens, la recherche des biomolécules antimicrobiennes devient plus d'une nécessité.

Dans un objectif bien précis, on a essayé par présent travail de déterminer l'efficacité antimicrobienne des extraits de la graine Algérienne de *Nigella sativa* L. (*in vitro*, *in vivo*) sur la flore buccale isolée chez les patients souffrants des gingivites et les parodontites.

Les premiers résultats de notre étude ont montré l'efficacité de la technique d'entraînement à la vapeur (*ex situ*) proposée par Blanchaud-Desce et *al.*, (1987) pour extraire plus de 0.4% des huiles essentielles avec plus de 70% en thymoquinone de l'HE de *N. sativa*.

Les analyses par la GPG-SM ont montré également la présence d'autres substances bioactives en faibles proportions (para-cymène, cis p-Menth-2-en-1-ol, isolongifolène, 2,3-Dihydrofarnesyl acetate Carvacrol, carvone, Camphor, Limonène.....).

Les dosages quantitatifs ont rapporté la richesse de l'EM en polyphénols et flavonoïdes par rapport à l'HE et la CCM a confirmé la présence de la catéchine, l'acide gallique et la quercétine dans les deux extraits.

Les résultats d'UPLC-SM ont révélés la présence des Flavonoïdes (Kaempferol ; Kaempferol-3-O-sophorotrioside-7-O-rhamnoside; Quercetin-O- α -rhamnosyl-triglucoside et

Conclusion et perspectives

d'autres flavonoïdes de formule générale $C_{33}H_{39}O_{21}$). Des saponines ont été également détectés (Tauroside E ; Tauroside H2) et des Phenols (Thymoquinol diglucoside).

La caractérisation des extraits, les résidus d'extraction et le broya de la graine de *N. sativa* par IRTF indique la présence des groupements fonctionnels C-H des alcanes, N-H des amides, C=O et C-O des esters, les groupements =C-H des alcènes, O-H et C-H des polyphénols ont été également détectés

Les résultats d'analyses microbiologiques ont permis d'isolés 71 souches microbiennes dans la cavité buccale des malades parodontaux. Ces isolats comprennent des coques à Gram positif (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, et *Micrococcus sp.*), des coques à Gram négatif (*Veillonella*) , des bacilles à Gram positif (*Bacillus. et Lactobacillus*), des bacille à Gram négatif (*Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Acinetobacter*, *Porphyromonas*,) et des *Candida albicans*, *Candida sp.et Sccharomyces*.

Les résultats de l'activité antimicrobienne obtenus par la méthode de micro-dilution ont confirmé la forte efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait brut methanolique contre la croissance des bactéries à Gram positif et à Gram négatif et les champignons microscopiques. Les doses de 16500µg/ml de l'huile essentielle et 62500µg/ml de l'extrait brut methanolique sont les plus efficace contre la plus part de la flore buccale testée.

Cette efficacité antimicrobienne n'était pas clairement visible par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé (problème de diffusion des principes actifs sur un milieu gélosé).

Selon les résultats microscopiques, les émulsions préparées à base de l'huile essentielle et d'extrait methanolique de la graine de *N. sativa* et Tween 80 (1.25 et 0.4% successivement) sont de type Nanoémulsions dont les résultats macroscopique et microscopiques ont révélé leur stabilité durant 60jours de conservation à 4°C, 20°C alors que la stabilité physico-chimique, microbiologique, biochimique est plus remarquable chez les *NEsHE* conservées à 4°C.

Notre étude a montrée des propriétés curatives, significatives et prometteuses de *NEsHE* (*in vivo*) sur le biofilm buccal avec une réduction de la flore totale de 10^{11} UFC/ml à

Conclusion et perspectives

10^6 UFC/ml pendant 21 jours de traitement sans des effets secondaires, en parallèle une efficacité significative a été enregistrée sur les indices cliniques des gingivites avec une stabilité totale de l'indice de tartre.

Ces résultats nous ont encouragé pour travailler plus sur la formulation des *NEs* à base des extraits de *N. sativa* stable à long terme et à différentes températures et permettre d'ouvrir des voix perspectives pour compléter cette étude par d'autres tests *in vivo* pour évaluer leur efficacité sur d'autres indices cliniques liés aux pathologies buccodentaires pour les indiqués comme traitement alternatif, complémentaire et préventif contre les maladies parodontales.



Références Bibliographiques



Références bibliographiques

Aas J.A., Paster B.J., Stoke L.N., Olsen I., Dewhirst F.E., 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J.clin. Microbiol.* 11, 5721-5732. doi: [10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005).

Abdesselam B-E., 2015. Approche ethnopharmacologique de *Nigella sativa* : de ses utilisations traditionnelles ancestrales aux études cliniques actuelles de ses principes actifs. These doctotat en pharmacie. Universite de Picardie Jules Verne- UFR de pharmacie.

Abu-Al-Basal M.A. , 2009.*In vitro* and *In vivo* Anti-Microbial Effects of *Nigella sativa* Linn. Seed Extracts Against Clinical Isolates from Skin Wound Infections. *American Journal of Applied Sciences* 6 (8),1440-1447

Adamu H.M., Ekanem E.O., Bulama S., 2010. Identification of Essential Oil Components from *Nigella sativa* Seed by Gas Chromatography-mass Spectroscopy. *PJ N* 9, 966-967.

AFSSAP , 2009. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé .Commission nationale de pharmacopée, direction des laboratoires et des contrôles- unité pharmacopée.23P.

AFSSAPS, 2001. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, Prescription des antibiotiques en odontologie et stomatologie- Argumentaire.

AFSSAPS, 2011. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Prescription des antibiotiques en pratique bucco-dentaire. 75P.

Akatshi Ohamamboya A., 2013.Dialogue entre les bactéries commensales et les cellules gingivales : une vision globale.these d'obtension d'un grade de Maître en sciences. Faculté des sciences et de génie, université de Laval .QUÉBEC.

Akram Khan M. ; Afzal M., 2016. Chemical composition of *Nigella sativa* Linn: Part 2 Recent advances. *Inflammopharmacol* 24, 67–79. Doi:[10.1007/s10787-016-0262-7](https://doi.org/10.1007/s10787-016-0262-7).

Al Turkmani M.O., Karabet F., Mokrani L., Soukkarieh C., 2015. Chemical composition and in vitro antioxidant activities of essential oil from *Nigella sativa* L. seeds cultivated in Syria. *International Journal of ChemTech Research* 8 (10),76-82. *Int.J. ChemTech Res.* 8(10), 76-82

Al-Bayaty F.H., Al-Koubaisi A.H., Ali N.A-W, Abdulla M.A., 2010. Effect of mouth wash extracted from *Salvadora persica* (Miswak) on dental plaque formation: A clinical trail. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(14),1446-1454. doi: [10.5897/JMPR10.198](https://doi.org/10.5897/JMPR10.198).

Ali A., 2016. Nanoémulsions d'intérêt pharmaceutique stabilisées par la beta-lactoglobuline. These de doctorat en Pharmacotechnie et biopharmacie, Ecole Doctorale N° 569, Universite Paris-Saclay.P216

Ali B.H., Blunden G., 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother. Res.* 17, 299-305. doi: [10.1002/ptr.1309](https://doi.org/10.1002/ptr.1309).

Aljabre S.H.M., Randhawa M.A., Akhtar N., Alakloby O.M., Alqurashi A.M., Aldossary A., 2005. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *J. Ethnopharmacol.* 101, 116-119. doi:[10.1016/j.jep.2005.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.002).

Amigoni Nicholas A., Georgiak et al., 2000. The use of sodium bicarbonate and hydrogen peroxide in periodontal therapy : a review, *JADA* 114,217-222.

Références bibliographiques

- Amin B. ; Hosseinzadeh H., 2015.** Black Cumin (*Nigella sativa*) and Its Active Constituent, Thymoquinone: An Overview on the Analgesic and Anti-inflammatory Effects. *Planta Med* 82 (01/02), 8-16.[doi.org/ 10.1055/s-0035-1557838](https://doi.org/10.1055/s-0035-1557838).
- Amoukoux J., 2003.** Larousse-Grande Atlas du corps humain : Description, fonction et pathologie. 157P.
- ANAES, 2002.** Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé- France- Service des recommandations et références professionnelles. Parodontopathies :Diagnostic et traitements.130P.
- Angleraud R., 1985 :** La gencive, Anatomie, histologie, A.O.S., 17-22- Applied and environmental microbiology 6951–6956.
- Ara N., Choudhury S. A. R., Ruhul A., 2005.** *In vitro* Antimicrobial Activity of the Volatile Oil of *Nigella Sativa* Linn Seeds.The Journal of Teachers Association RMC Rajshahi 18 (2), 109-112.
- Arnaud P., 1978.** Cours de chimie organique. Ed. Gauthier Villars.
- Arveux C., 2016.** Maladies parodontales chez le fumeur. Prise en charge à l'officine.Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Faculté des sciences pharmaceutiques, université Toulouse III Paul Sabatier.
- Atba N., 2008.** Formulation d'une émulsion pharmaceutique Huile de soja /Eau, Caractérisation et étude de stabilité physique. Mémoire de Magister -ecole nationale polytechnique, Département de Génie chimique, université USTHB-Algérie.
- Atma W., 2016.** Etude du pouvoir auto épurateur de quelques plantes (la phytothérapie). Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en sciences spécialité : chimie. Faculté des sciences exactes, université Mustapha Stambouli de Mascara. p126.
- Atta M.B., 2003.** Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chem.* 83, 63–68.
- Augusto Pfau E., Avila-Campos M.J., 2005.** *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* isolated from osseointegrated dental implants: colonization and antimicrobial susceptibility, *Brazilian Journal of Microbiology* 36,281-285.
- Avril J-L., Dabernat H., Denis F. et Monteil H., 2000.** Bactériologie clinique, 3^{ième} Ed. Ellipses France.
- Avula B., Wang Y.H., Ali Z., 2010.** Quantitative determination of chemical constituents from seeds of *Nigella sativa* L. using HPLC-UV and identification by LC-ESI-TOF. *Journal of AOAC International* 93(6), 1778-1787.[DOI: 10.1055/s-2009-1216511](https://doi.org/10.1055/s-2009-1216511).
- Azogui-Levy S. et Boy-Lefevre M.L., 2005.** La sante bucco-dentaire en France. ADSP n° 51,1-8.
- Balouiri M. , Sadiki M., S.K. Ibsouda, 2016.** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.

Références bibliographiques

- Bellair M., 2015.** La flore bactérienne dans la parodontite et la péri-implantite, similitudes et différences. Revue de la littérature. Thèse de doctorat en chirurgie dentaire. unité de formation et de recherche d'odontologie, Université de Nantes.
- Beloued A., 1998.** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires.
- Beltrán-Aguilar E.D., Eke P.I., Thornton-Evans G., Petersen P.E. , 2012.** Recording and surveillance systems for periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 60, 40-53.
- Benbelaid F., 2015.** Effets des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques sur *Enterococcus faecalis* responsable d'infections d'origine dentaire. These doctorat en Biologie, Option : Microbiologie. Faculté des sciences de la nature et de la vie de la terre et de l'univers. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.
- Benkaci-Ali F., 2007.** Etude de la composition chimique de la *Nigella sativa* originaire d'algerie. These de doctorat en chimie organique appliquée. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (U.S.T.H.B), Algerie.
- Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Meklati B.Y., Chemat F., 2007.** Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour Fragr. J.* 22, 148-153. doi: 10.1002/ffj.1773.
- Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Meklati B.Y., chemat F., 2007.** Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour Fragr. J.* 22: 148-153.
- Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Wathelet J.P., Marlier M. ,2010.** Chemical Composition of Volatile Oils from Algerian *Nigella sativa* L. seeds, *Journal of Essential Oil Research*, 22(4), 318-322. doi.org/10.1080/10412905.2010.9700335
- Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Wathelet J.P., Marlier M., 2010.** Chemical Composition of Volatile Oils from Algerian *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Essential Oil Research* 22(4), 318-322. doi.org/10.1080/10412905.2010.9700335
- Bercy et Tenenbaum. H., 1996.** Parodontologie du diagnostic à la pratique. De Boeck Université- Paris, Bruxelles, 289P.
- Berger L., 2010.** Le biofilm bactérien endodontique. These de doctorat en chirurgie dentaire. Faculté de chirurgie dentaire, Academie de Nancy-metz.universite Henry Poincare-Nancy 1
- Bertrand A.L., 2004.** Retention des streptocoques mutans sur des materiaux orthodontiques en fonction de differents procedes d'hygiene - etude *in vitro* – these de l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Sciences de la Vie et de la Terre.
- Bessedik A., Allem R., 2013.** Effect of essential oil of *Nigella sativa*, *African Journal of Biotechnology* 12(20), 3006-3012. doi: 10.5897/AJB2013.12070.
- Bidault P., Chandad F., Grenier D., 2007.** Risk of Bacterial Resistance Associated with Systemic Antibiotic Therapy in Periodontology. *JCDA* 73(8),721-725.
- Blanchaud-Desce M., Fosset B., Guyot F., Jullien L., Palacin S., 1987.** Chimie organique expérimentale. Ed Hermann. pp 13-48.

Références bibliographiques

- Bonner M., 2001.** La santé parodontale, l'approche microbienne moderne. Idem, Trois- Rivières, 188P.
- Bonnier G. ,1990.** La grande flore en couleur. Tome 1. Pp 17. Ed Belin, Paris.
- Borhan-Mojabi K., Shari M., Karagah T., Karimi H., 2012.** Efecacy of Different Concentrations of Garlic Extract in Reduction of Oral Salivary Microorganisms. Arch Iran Med. 15(2), 99-101.
- Bourgou S., Ksouri R., Bellila, A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B., 2008.** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. C. R. Biologies 331, 48-55. doi:10.1016/j.crv.2007.11.001.
- Breitung K. et Remmerbach T.W., 2010.** L'hyperplasie gingivale en tant qu'effet secondaire potentiel de l'amlodipine, un antagoniste calcique. Pratique quotidienne et formation complémentaire .Rev Mens Suisse Odontostomatol 120 (6), 529-531.
- Brossard H., Leyral G., Terry O., 2006.** Activités Technologiques en microbiologie, Tome 2, Bacteriologie systematique. Ed France.
- Burits M. and Bucar F., 2000.**Antioxidant Activity of *Nigella sativa* Essential Oil. Phytother. Res. 14, 323-328.
- Carpéné M-A , 2013.** Purification et caractérisation de signaux biologiques à l'état de traces. These Doctorat en Chimie, Biologie, Santé - CO042. Université de Toulouse.188P
- Chaieb K., Kouidhi B., Jrah, H., Mahdouani K., Bakhrouf A., 2011.** Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation.BMC Complementary and Alternative Medicine 11:29. doi.org/10.1186/1472-6882-11-29.
- 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(2), 673–681.
- Chevalier J.M. et Bonfils P. ,2001.** Anatomie- ORL, Ed Flammarion.
- Chevrel J.P., Gueraud J.P., Levy J.B., Dumas J.L., 2000.** Anatomie générale introduction à l'étude d'anatomie. 7^{ième} Ed., Masson. 115P.
- Colombier, M.L., Leroy, P., Yasukawa, K., 2006.**Bacterial tests on periodontitis. Bull. Acad. Natle Chir. Dent. 49, 97-102.
- Costa E.M., Silva S., Madureira A.R., Cardelle-Cobas A., Tavarria F.K., Pintado M.M., 2014.** A comprehensive study into the impact of a chitosan mouth wash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. Carbohydrate Polymers 101,1081– 1086.
- Da Silva N.B., Alexandria A.K., De Lima A.L., Claudino L.V., De Oliveira Carneiro T.F., Da costa A.C., A.M.G valença, Cavalcanti A.L., 2012.** *In vitro* antimicrobial activity of mouth washes and herbal products against dental biofilm-forming bacteria. Contemp Clin Dent 3(3), 302-305. Doi:10.4103/0976-237X.103623.
- Dandik L., Aksoy H.A., 1992.** The kinetics of hydrolysis of *Nigella sativa* (Black cumin) seed oil catalyzed by native lipase in ground seed. J. Am. Oil. Chem. Soc. 69,1239-1241.

Références bibliographiques

- Denis K.F.,2001.** Causation & pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology* 25, 8-20.
- Diallo A. M., 2005.** Etude des plantes medicinales de niafunke (region tombouctou), phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidacée). Ministère de l'éducation nationale- Université de bamako-faculte de medecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie (FMPOS).
- Dumant J., 1968.** Les muqueuse et la gencive : Les affections buccodentaires.Ed stomatol.Paris 71P.
- Duyninh T., Jame O., Bousquet P., Gibert P., Orti V., 2005.** Classification des maladies parodontales. *EMC-Ondologie* 1, 58–66. doi: [10.1016/j.emcodo.2004.12.001](https://doi.org/10.1016/j.emcodo.2004.12.001)
- Edgar M., Dawes C., O'Mullane D., 2012.** *Saliva and oral health*.fourth edition, Ed. Stephen Hancocks Limited.
- Edris A.E., Kalemba D., Adamiec J., Piątkowski M., 2016.** Microencapsulation of *Nigella sativa* oleoresin by spray drying for food and nutraceutical applications. *Food Chem.* 204, 326-333. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.143>
- El dajawi, 1996.** Encyclopedie des plantes medicinales et aromatiques, tome I, bibliothèque d'agriculture, Ed Madbouli (document en arabe)
- El madani A-I.K., 1999.** إتحاف الأحبة باستعمال الحبة السوداء . زيتها. دهنها. طحينها. دار الأمام مالك
- El-Beshbishy H.A., Mohamadin A.M., Abdel-Naim A.B., 2009.***In Vitro* evaluation of the antioxidant activities of grape seed (*Vitis vinifera*) extract, blackseed (*Nigella sativa*) extract and Curcumin, *Journal of Taibah University Medical Sciences* 4(1), 23-35.
- Farag M.A., Gad H.A, Heiss A.G., Wessjohann L.A., 2014.** Metabolomics driven analysis of six *Nigella* species seeds via UPLC-qTOF-MS and GC–MS coupled to chemometrics. *Food Chemistry* 151, 333–342.
- Ferdous A. J., Islam S. N., Ahsan M., Hasan C. M., Ahmed Z. U. ,1992.** *In Vitro* antibacterial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds against multiple Drug-resistant Isolates of *Shigella spp.* and Isolates of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*.*Phytotherapy research.* 6, 137-140.
- Fournier P., 1977.** Les quatre flores de France. Vol1. Ed. LE Chevalier.
- Gardner E., Gray D.J., O'rahilly, 1993.** *Anatomie*, volume2, Ed Reimpression.
- Genco R.J., Williams R.C., 2010.** *Periodontal Disease and Overall Health: A Clinician's*. 319P. Ed.Professional Audience Communications, Inc. PO Box 243.Yardley, Pennsylvania 19067 USA.
- Gendron R., Grenier D., Maheu-Robert, 2000.** La cavité buccale: une source de bactéries pathogènes pour les infections à distance. *Journal Dentaire du Québec* Vol. XXXVII – Juillet/Août, Université Laval.
- Gendron R., Grenier D., Maheu-Robert L-F., 2000.**The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. *Microbes and Infection*, 2, 897–906.
- Georges D., 2012.** Pathologies générales et salive. These doctorat en chirurgie dentaire. Faculte de chirurgie dentaire, université de Henri Poincare - Nancy 1.

Références bibliographiques

- Ghedira K., 2006.** La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie* 4, 1-7.
- Gildas B., 2005.** Les maladies parodontales : un facteur de risque additionnel pour les accouchements prématurés?. Thèse d'obtention du grade de maître es sciences dentaires faculté de médecine dentaire, université Laval .QUÉBEC.
- Goreja W.G., 2003.** Black Seed: Nature's Miracle Remedy, Amazing Herbs Press, New York, NY.
- Goren R., Bukovac M.J., Flore J.A., 1974.** Mechanism of indole-3-acetic acid conjugation. *Plant Physiology*, 53, 164-166. in Rouba L., (2011-2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols des graines de *Nigella sativa* L., these Magister en biochimie, option : biochimie appliquée, département de biochimie, faculté des sciences de la nature et de la vie, université Ferhat Abbas-Setif.
- Gorenflot R., 1994.** Biologie végétale. Plantes supérieures. Appareil végétatif. Ed. Masson. 83P.
- Greenish H.G., 1880.** Contribution to the Chemistry of *Nigella sativa*. *Pharmac J Trans* 10, 909-911.
- Guignard J-L., 1983.** Abrégés de botanique. Ed. Masson. Pp 127-136.
- Guignard J-L., 2000.** Biochimie végétale. Ed. Dunod.
- Gurpreet K. and Singh S. K., 2018.** Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. *Indian J Pharm Sci* 80(5),781-789. doi: [10.4172/pharmaceutical-sciences.1000422](https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000422).
- Halawani E., 2009.** Antibacterial Activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Advan. Biol. Res.* 3,148-152.
- Hashem F.M., El- Kiey M.A., 1982.** *Nigella sativa* seeds of Egypt. *J. Pharm. sci.* 3, 121-133.
- Hillman, J.D., Socransky, S.S., Shivers, M., 1985.** The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. *Arch Oral Biol* 30, 791-795, in : Tanner, A., Maiden, M.F.J, Paster, B.J., Dewhirst, F.E., 1994. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Periodontology* 2000 5, 26-51.
- Hoceini A., 2017.** Caractérisation de la microflore constitutive du biofilm bucco-dentaire de la plaque supra-gingivale chez des sujets indemnes de caries dentaires et des sujets cariés. Thèse Doctorat en Biologie, Option en maîtrise du Développement Microbien. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université de Tlemcen.
- Hoceini A., Khelil N.K., Ben-Yelles I., Mesli A., Ziouani S., Ghellai L., Aissaoui N., Nas F., Arab M., 2016.** Caries-related factors and bacterial composition of supragingival plaques in caries free and caries active Algerian adults. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 6(8), 720–726. doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.011.
- Holt S.C., Bramanti T.E., 1991.** Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2, 177–281.
- Houcher Z., Boudiaf K., Benboubetra M., Houcher B., 2007.** Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa* L. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats. *Pteridines* 18, 8-18.

Références bibliographiques

- Houle M.A., Grenier D., 2003.** Maladies parodontales : connaissances actuelles Current concepts in periodontal diseases. Médecine et maladies infectieuses 33, 331–340. doi: 10.1016/S0399-077X(03)00203-8.
- Houvion E., 2014.** Le biofilm dentaire : composition, formation et propriétés. Thèse de doctorat en chirurgie dentaire .Academie de Nancy-Metz, faculte d'odontologie universite de Lorraine.
- INSERM, 1999.** Institut national de la santé et de la recherche médicale. Maladies parodontales « Thérapeutiques et prévention » Expertise Collective. Rapport établi à la demande de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale. Ed. INSERM, Paris.
- Iserin P., Masson M., Restellini J-P., 1997.** Encyclopédie des plantes médicinales. Identification. Préparations. Soins. Ed. Larousse.
- Jaiswal M., Dudhe R., Sharma P. K., 2015.** Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system,3 Biotech 5,123-127. doi 10.1007/s13205-014-0214-0.
- Jauzein P., 1995.** Flores des champs cultivés. Ed. INRA. Pp: 603-615.
- Joffin J. et Leyral G., 2006.** Microbiologie technique, centre regional de documentation pedagogique d'aquitaine, 4^{ieme} edition.
- Jrah Harzallah H., Kouidhi B., Flamini G., Bakhrouf A., Mahjoub T., 2011.**Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. Food Chem. 129, 1469-1474. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.117.
- Kamina P., 2006.** Anatomie clinique, tome 2, 3^{ieme} Ed, Maloine, Parie .Pp 285-316.
- Karrandou A. ,2016.** La Nigelle, une panacée peu connue en Occident .Thèse de doctorat en pharmacie, faculté de pharmacie de Dijon, Université de Bourgogne, 66P.
- Khoddami A., Ghazali H. M., Yassoralipour A. , Ramakrishnan Y. , Ganjloo A.,2011.** Physicochemical characteristics of *Nigella* Seed (*Nigella sativa* L.) oil as affected by different extraction methods. J Am Oil Chem Soc.88, 533–540. doi 10.1007/s11746-010-1687-6.
- Kökdil, G., Delialioğlu, N., Özbilgin, B., Emekdaş, G., 2005.**Antilisterial activity of *ballota*species growing in turkey- antibacterial activity screening of *Nigella* L. species growing in Turkey. J. Fac. Pharm. 34, 183 -190.
- Könönen E., Asikainen S., Saarela M., Karjalainen J., Jousimies-Somer H., 1994.** The oral gram-negative anaerobic microflora in young children: longitudinal changes from edentulous to dentate mouth. Oral Microbiol.Immunol. 9(3), 136-141.
- Kukreja B.J., Dodwad V., 2012.** Herbal mouthwashes – A gift of nature, International Journal of Pharma and Bio Sciences 3(2), 46-52.
- Kumara S.S.M., Huat B.T., 2001.** Extraction, isolation and characterisation of antitumor principle, α -hederin, from the seeds of *Nigelle sativa*. Planta Med 67, 29-32.
- Lamendin H., Toscano G., Requirand P., 2004.** Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires. EMC-Dentisterie 1,179–192. doi: 10.1016/S1762-5661(03)00008-4.

Références bibliographiques

Le Piouff G., 2006. Stratégie thérapeutique parodontale lors des modifications hormonales de la femme. thèse de doctorat en chirurgie dentaire. Unité de formation et de recherche d'odontologie. Université de Nantes.

Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J. Lee C.Y., 2003. Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry* 51, 7292-7295.

Lemaoui A., 2010-2011 . Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*. L Algérienne, thèse de Magister en biochimie, option : biochimie appliquée, Faculté des sciences de la nature et de la vie, département de biochimie. Université Ferhat Abbas –Setif (Algerie).

Leyral, G., 1973. Bactériologie-BA73, séquences 1 et 2, Ed. CNED, Toulouse.

Leyral, G., Joffin, J.N., 1998. Microbiologie technique: tome 2, Documentation technique (Biologie technique). CRDP d'Aquitaine, Bordeaux.

Lindhe J., 1986. Manuel de parodontologie Clinique, Ed CdP, Paris, Pp.25-29-32-136-146-

Lindhe J., Karring T., Lang N.P., 2003. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 4th Ed., Blackwell Munksgaard, p1044.

Liu W., Røder H.L., Madsen J.S., Bjarnsholt T., Sørensen S.J., Burmølle M., 2016. Interspecific Bacterial Interactions are Reflected in Multispecies Biofilm Spatial Organization. *Frontiers in Microbiology*. *Front. Microbiol.* 7:1366. doi: 10.3389/fmicb.2016.01366.

Mahdi E.S., Sakeena M.H.F, Abdulkarim M.F, Abdullah G.Z., Abdul Sattar M., Noor A.M., 2011. Effect of surfactant and surfactant blends on pseudoternary phase diagram behavior of newly synthesized palm kernel oil esters ; *Drug Design, Development and Therapy* 5, 311–323.

Mahmoudi H., Aouadhi C., Kaddour R., Gruber M., Zargouni H., Zaouali W., Ben Hamida, N., Ben Nasri M., Ouerghi Z., Hosni, K., 2016. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of two cultivated *Cistus* species from Tunisia. *Biosci. J.* 32, 226-237.

Mangal B., Sugandhi A., Kumathalli K.I., Sridhar R., 2012. Alternative Medicine in Periodontal Therapy. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*. *J Acupunct Meridian Stud* 5(2),51-56. doi:10.1016/j.jams.2012.01.001

Manju S., Malaikozhundan B., Vijayakumar S., Shanthi S., Jaishabanu A., Ekambaram P., Vaseeharan B., 2016. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic effects of *Nigella sativa* essential oil coated gold nanoparticles, *Microbial Pathogenesis* 91, 129-135. doi: 10.1016/j.micpath.2015.11.021.

Marchal N., Bourdon J.L., Richard C., 1982. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries, 482P.

Mason T. L. et B. P. Wasserman., 1987. Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry* 26, 2197- 2202.

Meziti A., 2009. Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L-Étude *in vitro* et *in vivo*. Faculté des Sciences-Département des Sciences Biologiques-Université EL-Haj Lakhdar-Algérie.

Références bibliographiques

- Meziti A., Meziti H., Boudiaf K., Benboubetra M., Bouriche H., 2012.** Polyphenolic profile and antioxidant activities of *Nigella Sativa* seed extracts *in vitro* and *in vivo*. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering 6(4),109-117.
- Mohamed F., Mohd Shafri M. A., mohd Nor N.H., 2014.** Preparation and characterization of *Nigella sativa* microemulsions. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6(9), 485-489.
- Mohammed N.K., Abd Manap M.Y., Tan C.P., Muhiaddin B.J., Alhelli A.M., Meor Hussin A.S., 2016.** The effects of different extraction methods on antioxidant properties, chemical composition, and thermal behavior of black seed (*Nigella sativa* L.) oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 6273817, 10 pages doi.org/10.1155/2016/6273817.
- Mohammed N.K., Tan C.P., Abd Manap Y., Alhelli A.M. , Meor Hussin A.S., 2017.** Process conditions of spray drying microencapsulation of *Nigella sativa* oil. Powder Technology 315, 1–14.
- Molly K., Vande Woestyne M., Verstaete W., 1993.** Development of a 5 step multi-camber reactor as a simulation of human intestinal microbial ecosystem. Applied Microbiology and Biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 254-258, In : Chelli-Chentouf, N., TirTouilMeddah, A., Mullie, C., Aoues, A., Meddah, B., 2012. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of Algerian Hoggar *Salvadora persica* L. extracts against microbial strains from children's oral cavity. J. Ethnopharmacol. 144, 57-66.
- Mombelli A., McNabb H., Lang N.P., 1991.** Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. J.Periodontal Res. 26(4), 308-313.
- Mouton C. et Robert J-C., 1994.** Infections loco-régionales et métastase des infections bucco-dentaires, Dans: Mouton, C., Robert, J.-C. (Eds.) Pathologies buccales d'origine bactérienne. Masson- Paris, Pp161-173.
- Mraihi F., Chérif J.K., Trabelsi-Ayadi M., 2008.** Etude physicochimiques de trois variétés de graines de *nigella sativa* L. et de leurs extraits huileux- JNC 15, 21-24.
- Multon J-L., 1991.** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Analyse des constituants alimentaires. Vol. 4.
- Mundada V., Patel M., Sawant K., 2016.** Submicron Emulsions and Their Applications in Oral Delivery. Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems 33(3), 265-308. DOI: [10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016017218](https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016017218).
- Nagappan N., John J., 2012.** Antimicrobial Efficacy of Herbal and Chlorhexidine Mouth rinse. Journal of Dental and Medical Sciences 2 (4), 5-10.
- Naresh K., Bhawani S., Maneesh Kumar T., 2014.** Ultra performance liquid chromatography, Int. J. Pharm. Med. & Bio. Sc. 3(3), 84-94.
- Nergiz C., Otles S., 1993.** Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds. Food Chemistry 48, 259-261.
- Niu C. and Gilbert E. S., 2004.** Colorimetric method for Identifying plant biofilm formation and structure essential oil components that affect. Appl. Environ. Microbiol. 70(12), 6951-6956.

Références bibliographiques

Nivetha K., Prasanna G., 2016. GC-MS and FT-IR analysis of *Nigella sativa* L. seeds. Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. 3(6), 45-54.

Nivetha K. and Prasanna G., 2016. GC-MS and FT-IR Analysis of *Nigella sativa* L. Seeds, International Journal of Advanced Research in Biological Sciences. Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. 3(6), 45-54.

Obame L-C., Koudou J. Chalchat J-C, Bassolé I., Edou P., Aboubakar S Ouattara, Alfred S. Traore, 2007. Volatile components, antioxidant and antibacterial activities of *Dacryodes buettneri* H. J. Lam. essential oil from Gabon. Scientific Research and Essay 2 (11), 491-495.

Orsi – Llinares F., 2005. La nigelle, une épice d'intérêt médicinal. Thèse de doctorat en pharmacie- Université Joseph Fourier, faculté de pharmacie de Grenoble, 159P.

Orti V., Jame O., Calas I., Gibert P., 2004. Antibiothérapie et maladies parodontales Antibiotherapy and periodontal diseases. EMC-Dentisterie 1, 62-70. doi: 10.1016/S1762-5661(03)00002-3.

Pace J. L., Rupp M., Finch R.G., 2006. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy ... CRC Press, Taylor & Francis Group, 494P.

Palombo E.A., 2011. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2011, Article ID 680354, 15 pages. doi:10.1093/ecam/nep067.

Paul K.G., 1987. Peroxidases, past and present. J. Oral Pathol. 6, 408-411.

PESSEL F., 2013. Synthèse éco-compatible de flavonoïdes fonctionnalisés par le glucose comme antioxydants potentiels. Thèse de doctorat en Chimie Organique. Université Paris-sud, École Doctorale: ED 470, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay. 173P.

Peter Wuelfing W., Kosuda K., Templeton A. C., Harman A., Mowery M.D., Reed R.A., 2006. Polysorbate 80 UV/vis spectral and chromatographic characteristics –defining boundary conditions for use of the surfactant in dissolution analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41, 774–782.

Peyret-Lacombe A., 2007. Etude de l'immuno-reactivité épithéliale gingivale en réponse à deux bactéries commensales : Implication du TLR2. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse en immunologie.

Phillips J. D., 1992. Medicinal plants. Biologist 39, 187–191.

Picard D., 2004. La bouche révèle les secrets du corps .Pourquoi et comment dépister la plus fréquente des infections buccales?. Le Médecin du Québec 39(7).

Pierat N., 2010. Préparations d'émulsions par inversion de phase induite par agitation. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de pharmacie, Université Henri Poincaré - Nancy 1.

Piette É., Mahy P., 2005. Stomatites bactériennes « non spécifiques ». EMC (Elsevier SAS, Paris), Stomatologie, 22-045-A-10.

Références bibliographiques

Piras A., Rosa B., Marongiu S., Porcedda D., Falconieri M.A., Dessi B., Ozcelik U., Koca U., 2013. Chemical composition and *in vitro* bioactivity of the volatile and fixed oils of *Nigella sativa* L. extracted by supercritical carbon dioxide, *Industrial Crops and Products* 46, 317-323.

Rams T.E., Feik D., Slots J., 1990. Staphylococci in human periodontal diseases. *Oral Microbiol. Immunol.* 5, 29-32, in: Tanner A., Maiden M.F.J., Paster B.J., Dewhirst F.E., 1994. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Periodontol.* 2000, 5, 26-51.

Rathee P.S., Mishra S.H. et Kaushal R., 1982. Antimicrobial activity of essential oil, fixed oil and unsaponifiable matter of *Nigella sativa*. *Indian J Pharm Sci* 44(1), 8-10

Review of In Vivo Studies. *International Journal of Molecular Sciences. Int. J. Mol. Sci.*, 19, 1085. doi:10.3390/ijms19041085.

Richard H. et Multon J-L., 1992. Les arômes alimentaires. Ed. Lavoisier.

Riov et Gottlieb, 2006. Metabolism of auxin in pine tissues : Indole-3-acetic acid conjugation. *Physiologia Plantarum* 50,347-352 in Kebbab , 2014. Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus de margines d'olives de la variété « Chamlal » : évaluation de l'activité avant et après glycosylation. Mémoire de Magister en sciences biologiques, option biochimie appliquée aux bioindustries. faculté des sciences biologiques et sciences agronomique, département de biochimie – microbiologie. université Mouloud Mammeri-Tizi Ouzou 117P.

Rizvi A.H., Abid Ali Khan, M.M., Saxena G., Naqvi A.A., 2012. A comparative study on the chemical composition of oil obtained from whole seeds and crushed seeds of *Nigella sativa* L. from India. *J. Biol. Chem. Research.* 29, 44-51.

Saeki Y., Ito Y., Shibata M., Sato Y., Okuda K., Takazoe I., 1989. Antimicrobial action of natural substances on oral bacteria, "Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. The Bulletin of Tokyo Dental College, 30, 129-135. In Palombo E.A., 2011. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Hindawi Publishing Corporation; Volume 2011, Article ID 680354, 15 pages. doi:10.1093/ecam/nep067.

Salami E., Kordali S., Kotan R., Cakir A., Kaya Y., 2007. Chemical compositions antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 569-581. Lemaoui A., (2010-2011) .Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa* L. Algérienne, these de Magister en biochimie,option : biochimie appliquee, Faculte des sciences de la nature et de la vie,département de biochimie. Université Ferhat Abbas –Setif (Algerie).

Saleh AI-Jassir M., 1992. Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry* 45, 239-242.

Salem M.A ., 2001c. Effect of some heat treatment on nigella seeds characteristics. 1-Some physical and chemical properties of nigella seed oil. *J Agri Res* 27,471-486.

Salem M.Z.M., Ali H.M., El-Shanhorey N.A., Abdel-Megeed A., 2013a. Evaluation of extracts and essential oil from *Callistemon viminalis* leaves: Antibacterial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 785-791.

Références bibliographiques

- Salem M.Z.M., Aly H., Gohar Y., El-Sayed, A.W., 2013b.** Biological activity of extracts from *Morus alba* L., *Albizia lebbek* (L.) Benth. and *Casuarina glauca* Sieber against the growth of some pathogenic bacteria. IJAFR 2, 9-22.
- Salman M. T., Khan R. A., Shukla I. 2008.** Antimicrobial activity of Black Cumin seeds (*Nigella sativa*) against multidrug resistant strains of coagulase negative Staphylococci. Hippocratic Journal of Unani Medicine 3(1), 107-112.
- Salman M. T., Khan R. A., Shukla I., 2009.** A Study of *Nigella sativa* Linn. seeds for antimicrobial activity against multidrug resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Hippocratic Journal of Unani Medicine 4(4), 95-104.
- Salman M.T., Khan R.A., Shukla I., 2016.** Antibacterial activity of *Nigella sativa* Linn. seeds against multiple antibiotics resistant clinical strains of *Staphylococcus aureus*. Int Arch BioMed Clin Res. 2, 96-99. doi: 10.21276/iabcr.2016.2.3.24.
- Samot J., 2012.** Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux. These doctorat en Sciences, Technologie, Santé, option : Microbiologie-Immunologie. Université de Bordeaux 2.
- Sato M., Tsuchiya H., Takase A., Kureshiro H., Tanigaki S., Linuma M., 1995.** Antibacterial activity of flavone isolated from *Sophora exigua* against mathicillin resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. Phytother. Res. 509-512.
- Scandorieiro S., Camargo L.C., Lancheros C.A.C., Yamada-Ogatta S.F., Nakamura C.V., Oliveira A.G., Andrade C.G.T.J., Duran, N., Nakazato, G., Kobayashi R.K.T., 2016.** Synergistic and additive effect of Oregano essential oil and biological Silver nanoparticles against Multidrug-Resistant bacterial strains. Front. Microbiol. 7:760. doi: 10.3389/fmicb.2016.00760.
- Shaaban H.A., Sadek Z., Edris A.E., Saad-Hussein A., 2015.** Analysis and antibacterial activity of *Nigella sativa* essential oil formulated in microemulsion system. J. Oleo Sci. 64(2), 223-232.
- Shafiei Z., Shuhairi N.N., Shah Yap N.Md F., Harry Sibungkil C-A., Latip J., 2012.** Antibacterial activity of *Myristica fragrans* against oral pathogens. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2012, Article ID 825362, 7 pages. doi:10.1155/2012/825362.
- Sheliya K. G., Shah K. V., 2013.** Ultra performance liquid chromatography (UPLC): a modern chromatography technique, pharma science monitor 4(3), 78-99.
- Shetty P.R., Setty S.B., Kamat S.S., Aldarti A.S, Shetty S.N., 2013.** Comparison of the antigingivitis and antiplaque efficacy of the herboral (herbal extract) mouthwash with chlorhexidine and listerine mouthwashes: a clinical study. Pakistan Oral & Dental Journal 33(1), 76-81.
- Shetty P.R., Setty S.B., Kamat S.S., Aldarti A.S., Shetty S.N., 2013.** Comparison of the antigingivitis and antiplaque efficacy of the herboral (herbal extract) mouthwash with Chlorhexidine and Listerine mouthwashes: a clinical study. Pakistan Oral & Dental Journal 33 (1), 76-81.
- Shohayeb M., Halawani E., 2012.** Comparative Antimicrobial Activity of Some Active Constituents of *N. sativa* L. World Applied Sciences Journal 20 (2), 182-189. doi: 10.5829/idosi.wasj.2012.20.02.7156
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J. Biol. Chem. 269, 8022-8028 in Guinoiseau E, 2010. Molécules antibactériennes issues

Références bibliographiques

d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse doctorat en Biochimie - Biologie moléculaire; Université de Corse-Pasquale Paoli.

Silva N., Abusleme L., Bravo D., Dutzan N., Garcia-Sesnich J., Vernal R., Hernández M., Gamonal J., 2015. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci.* 23(3), 329-355. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-775720140259>.

Simain F., Rompen E., Heinen E., 2010. Biofilms bactériens et médecine dentaire. *Rev Med Liège* 65(10), 569-573.

Singh G., Marimuthu P., de Heluani C.S, Catalan C., 2005. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa*. *J Sci Food Agric* 85,2297–2306. doi: 10.1002/jsfa.2255.

Sobouti F., Rakhshan Vahid, Heydari M., Keikavusi S., Dadgar S., Shariati M., 2018. Effects of fixed orthodontic treatment and two new mouth rinses on gingival health:A prospective cohort followed by a single-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *International Orthodontics* 16,12-30. doi.org/10.1016/j.ortho.2018.01.027.

Souto R., Silva-Boghossian C.M., Colombo A.P., 2014. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Braz. J. Microbiol.* 45, 495-501.

Steinberg D., Feldman M., Ofek I., Weiss E. I., 2004. Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (1), 86–89.

Subramaniam P., Gupta T., 2013. Efficacy of a Herbal Mouthrinse on Oral Microbial Load in Down Syndrome Children. *International Journal of Herbal Medicine* 1(4), 50-54.

Sulaiman F., Khiljee S., Ur Rehman N., Ishaque S., Masood, Muneeb Anjum S.M.,2014. formulation of microemulsion containing *Nigella Sativa* Honey and Propolis and evaluation of its burn healing potential. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 27(1), 1-9.

Suthar M. P. , Patel P. N., Shah T. G., Patel R. K., Patel S. K., 2010. *In vitro* Screening of *Nigella sativa* seeds for antifungal activity. *International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences* 1 (2), 84-91.

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, 404-410.

Tanis H., Aygan A., Digrak M., 2009. Antimicrobial Activity of Four *Nigella* Species Grown in Southern Turkey. *International journal of agriculture & biology* 11, 771–774 .

Tanner A., Maiden M.F.J, Paster B.J., Dewhirst F.E., 1994. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Periodontol.* 2000, 5, 26-51.

Taşkin M.K. , Alankuş ÇalışkanÖ. , Anil Hı, Abou-Gazar H., Khan I. A., Bedir E., 2005. Triterpene Saponins from *Nigella sativa* L. *Turk. J. Chem.* 29, 561 – 569.

Tekbas A. , Huebner J., Settmacher U., Dahmen U.,2018. Plants and Surgery: The Protective Effects of Thymoquinone on Hepatic Injury-A Systematic. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1085. doi:10.3390/ijms19041085.

Références bibliographiques

Toama M.A., EL-Alfy T.S., EL-Fatatry, H.M., 1974. Antimicrobial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* Linnaeus Seeds. Antimicrobial agents and chemotherapy. Antimicrob. Ag. Chemother. 6, 225-226.

Toma C.C. , Olah N.K. , Vlase L. , Mogoşan C., Mocan A. ,2015. Comparative studies on polyphenolic composition, antioxidant and diuretic effects of *Nigella sativa* L. (Black Cumin) and *Nigella damascena* L. (Lady-in-a-Mist) seeds. Molecules 20, 9560-9574.

Toma C-Crina, N-K. Olah , L. Vlase , C. Mogoşan, A. Mocan , 2015. Comparative studies on polyphenolic composition, antioxidant and diuretic effects of *Nigella sativa* L. (Black Cumin) and *Nigella damascena* L. (Lady-in-a-Mist) seeds. Molecules, 20 (6), 9560-9574. doi:10.3390/molecules20069560.

Toparslan C., 2012. À propos de *Nigella sativa* L. these de Doctorat en Pharmacie. Faculté de pharmacie, université de Lorraine.

Topcagic A., Zeljkovic S.C., Karalija E., Galijasevic S., Sofic E., 2017. Evaluation of phenolic profile, enzyme inhibitory and antimicrobial activities of *Nigella sativa* L. seed extracts. Bosnian journal of basic medical sciences. Bosn J Basic Med Sci. 17(4), 286-294. doi: <http://dx.doi.org/10.17305/bjbms.2017.2049>

Topozada H.H., Mazloun H.A. et El-Dakhakhny M., 1965. The antibacterial properties of *Nigella sativa* seeds. Active principle of some clinical application. J Egypt Med Ass 48 (Suppl.), 187-202.

Topozada H.H., Masloun H., El-Dakhakhany M., 1965. The anti-bacterial properties of *Nigella sativa* seeds: Active principle with some clinical application. J. Egypt. Med. Asso., 48(suppl), 187-202, in: Shohayeb M., Halawani E., 2012. Comparative antimicrobial activity of some active constituents of *N. sativa* L. World Appl. Sci. J. 20, 182-189. doi: 10.5829/idosi.wasj.2012.20.02.7156.

Touzouirt S., Limani Ch, Oukaci F., Ahmed Zaïd T., Nabiev M., 2016. Optimisation de la stabilité d'une émulsion de Pickering H/E a l'aide de la méthodologie des surfaces de réponses. The Canadian journal of chemical engineering volume 9999. doi 10.1002/cjce.22649.

Trebosc Rouch E., 2015. Amelioration de l'hygiene buccodentaire par le conseil en officine. These de doctorat en pharmacie. Faculte des sciences pharmaceutiques. Universite Toulouse III Paul Sabatier.

Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T., Inuma M., 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol. 50: 27–34.

Tuter M., Aksoy H.A., Ustun G., Riva S., Secundo F., Ipekler S., 2003. Partial purification of *Nigella sativa* L. seed lipase and its application in hydrolytic reactions. Enrichment of γ -linolenic acid from borage oil. Journal of the American Oil Chemists' Society. 80: 237-241.

Uras Ş.S., Silahtaroglu S., İlçim A., Kökdil G., 2010. Fatty acid, tocopherol, mineral composition, total phenolic, flavonoid, thymoquinone content, and antioxidant activity of *Nigella sativa* L. J. Fac. Pharm, Ankara 39 (3), 173-186.

Vaca Medina G., 2010. Elaboration des émulsions natives issues des graines oléoprotéagineuses et transformation catalytique de la fraction lipidique en biolubrifiants ecolabellisables. These doctorat en Sciences des Agroressources. Institut National Polytechnique de Toulouse, Université de toulouse.

Références bibliographiques

Vacharet N., 2008. Bouche, fonctions de la cavité buccale,UCB Lyon.

Van Leeuwen M.P.C, Slot D.E., Van der Weijden G.A., 2011.Essential Oils Compared to Chlorhexidine With Respect to Plaque and Parameters of Gingival Inflammation: A Systematic Review. J Periodontol 82,174-194. doi: **10.1902/jop.2010.100266.**

Vervelle A., Mouhyi J., Del Corso M., Hippolyte M.-P., Sammartino G., Dohan Ehrenfest D.M., 2010. Bains de bouche aux extraits naturels microencapsulés : effets sur la plaque dentaire et la gingivite. Rev Stomatol Chir Maxillofac 111,148-151.

Vlachoianis C., Chrubasik-Hausmann S., Hellwig E., Vach K., Al-Ahmad A., 2018. Activity of preparations from *Spilanthes oleracea*, propolis, *Nigella sativa*, and black garlic on different microorganisms involved in oral diseases and on total human salivary bacteria: Apilot study. Phytotherapy Research. 1-10. doi: **10.1002/ptr.6129.**

Vogt M., Sallum A.W, Cecatti J.G., Morais S.S., 2012. Factors associated with the prevalence of periodontal disease in low-risk pregnant women. Reproductive Health. 9:3. doi:**10.1186/1742-4755-9-3**

Yacoubi A., Djamila B., Makhrelouf L., Bensoltane A., 2010.Microbiological Study of Periodontitis in the West of Algeria. World J. Med. Sci. 5, 7-12.

Zannini M., 2011. Préparation parodontale pré-orthodontique des migrations dentaires d'origine pathologique. These de doctorat en chirurgie dentaire. Faculte de chirurgie dentaire. Université Henri Poincare Nancy I.

Zhiri A., 2006. Aromathérapie. Nutra news, science, nutrition, prévention et santé, Ed Fondation pour le libre choix 2-16.

Zijnge V., Thomas A., Thomas T., Rudolf G., 2012. Subgingival biofilm structure. Frontiers of Oral Biology 15,1-16. doi: <https://doi.org/10.1159/000329667>

Zijnge V., Van Leeuwen M.B.M., Degener J.E., Abbas F., Thurnheer T., Gmur R., Harmsen H. J. M., 2010. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. PLoS ONE 5(2), e9321. doi:**10.1371/journal.pone.0009321**

କର

Annexes

କର



République Algérienne Démocratique et Populaire
Société Par Action - Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques - Expertise
S.P.A.C.R.A.P.C.Expertise
Capital Social : 7 000 000 DA Filiale à 100% du C.R.A.P.C.-MESRS
Adresse : Frères Belhadj Bou-Ismaïl (w).TIPASA.
RC N° :42/00-0524325B13 NIF N° :001342052432552 NIS N° :001342260014166001 N° Article : 42260289222
N° Compte Bancaire : 00400184401001356312/CPA Agence Tipasa (00184)
Tél : 020.53.38.84 Tél/Fax : 024 32 58 93 / 024 31 41 41

**Bulletin d'Analyse N° 000121/2017/ SPA CRAPC EXPERTISE
Du 14/05/2017**

N° du Dossier : 0000307/2017 Relatif à l'analyse d'un échantillon par GC-MS
Date d'Enregistrement : 27/04/2017
Demandeur : KIARI Fatima
Adresse : Mascara
RC N° :
NIF N° :
NIS N° :
ART N° :

I. Conditions d'analyse :

Injecteur :

Température : 250°C
Mode d'injection : Split 20:1
Volume injecté : 0.2 µl

Colonne :

Type : HP-5MS
Dimensions : long 30 m * D int 0.25 mm * épaisseur film 0.25 µm
Phase stationnaire : 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane. (Autre : Spécifier)

Température du four :

60°C pendant 8 min, 2°C/min jusqu'à 250°C, isotherme pendant 10 min.
Durée d'analyse : 113 min
Gaz vecteur : Hélium pureté : N 6
Débit GV : 0.5 ml/min

Détecteur de masse :

Mode d'analyse : Scan TIC (de 30 à 550)
Délai du solvant : 3.5 min
Température de l'interface : 270 °c
Type d'ionisation : Impact électronique
Intensité du filament : 70 év
Type de l'analyseur de masse : Quadripôles
Température de la source : 230 °c

Equipement :

Chromatographe : Hewlett Packard Agilent 6890 plus
Spectromètre de masse : Hewlett Packard Agilent 5973

II. Résultats d'analyse :

Les résultats et interprétation sont regroupés dans le CD en ci-joint.

CACHET ET SIGNATURE

LAARABA Rachid
Directeur Technique



*République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche scientifique
Université Mustapha Stambouli de Mascara
Faculté des sciences de la nature et de la vie*

Questionnaire

| |
|----------------------------|
| Nom :- _____ |
| Prénom : _____ |
| Sexe : _____ L'age : _____ |
| Lieu de naissance : _____ |
| Adresse : _____ _____ |
| Activité:- _____ |
| La taille: _____ |
| Le poids: _____ |

L'hygiène bucco-dentaire

Bonne

Moyenne

Mauvaise

L'usage d'un rince-bouche

Oui

Non

Fumer

Oui

Non

Type de tabac

Nombre de cigarette/jour

Les antécédents médicaux

.....

Examen extra buccal

L'examen visuel et la palpation de la tête et du cou.....

.....
.....
.....
.....

Odeur intra buccal

Mauvaise odeur Moyenne Faible

Indice de plaque (IPI)

- 0 = pas de plaque
- 1 = un film adhère au bord marginal libre de la dent
- 2 = accumulation modérée de dépôt mou
- 3 = surface dentaire recouverte d'une quantité abondante de plaque

Indice parodontal (IP)

- 0 = dent au parodonte sain
- 1 = inflammatmion gingivale autour d'une partie de la dent
- 2 = inflammation gingivale encerclant la dent
- 6 = formation d'une poche
- 8 = perte de la fonction par une mobilité excessive

Indice de maladie parodontale (IMP)

- 0 = pas d'inflammation
- 1 = inflammation sans saignement
- 2 = inflammation + saignement provoqué
- 3 = ulcération + saignement spontané

Indice gingival (IG)

Quatre degrés de sévérité de l'inflammation gingivale sont évalués

- 0 = pas d'inflammation
- 1 = inflammation sans saignement
- 2 = inflammation + saignement provoqué

3 = ulcération + saignement spontané

Indice d'hygiène bucco-dentaire (IHB)

Principe de l'indice IHB. Cet indice comprend deux composantes distinctes:

1- L'indice de débris (ID) qui mesure l'extension coronaire des dépôts mous jusqu'au premier, deuxième ou dernier tiers des faces vestibulaires ou linguales des dents:

0 = pas de débris

1 = 1/3 de la face est recouverte de débris

2 = 2/3 de la face est recouverte de débris

3 = toute la face est recouverte de débris

2- L'indice de tartre (IT) qui mesure l'extension coronaire correspondante du tartre sous-gingival sous la forme de dépôts isolés ou d'une bande continue:

0 = pas de tartre

1 = 1/3 de la face est recouverte de tartre

2 = 2/3 de la face est recouverte de tartre

3 = toute la face est recouverte de tartre)

Le score de l'IHB est la somme des scores de l>ID et de l'IT.

Indice de mobilité

Indice de MÜHLEMANN (1960)

Il est possible de quantifier la mobilité en utilisant l'indice de MUHLEMANN. Cet indice a été adopté par l'A.R.P.A (Association pour la recherche sur les parodontopathies).

Indice 0 : Ankylose.

Indice 1 : Mobilité transversale perceptible au toucher.

Indice 2 : Mobilité perceptible, visible à l'oeil nu et inférieure à 1 mm.

Indice 3 : Mobilité visible à l'oeil nu et supérieure à 1 mm.

Indice 4 : Mobilité axiale.

L'intérêt de cet indice réside dans sa simplicité et dans sa facilité d'utilisation.

Indice de Prichard (1973)

Ici, le degré de mobilité n'est pas chiffré. Prichard se contente de diversifier les mobilités en :

Mobilité légère ;

Mobilité modérée ;

Mobilité importante : dans le sens transversal associe a un déplacement vertical dans l'alvéole.

Des signes + ou - peuvent être rattaches a cet indice pour lui donner plus de précision.

Indice d'inflammation gingivale (Loé et Silness)

0= gencive saine

1=légère inflammation, légère changement de couleur, pas de saignement au sondage

2=Inflammation modérée, rougeur, œdème, saignement provoqué

3=Inflammations sévère, rougeur, œdème marqué, tendance au saignement spontané

Indice CPITN: Index communautaire des besoins en traitements parodontaux

0 = gencive saine

1 = saignement au sondage

2 = présence de tartre

3 = poche de 4 à 5 mm

4 = poche de 6 mm ou plus

Les besoins en traitement (TN: treatment needs) sont déterminés en fonction du plus haut score CPITN obtenu par sextant.

Commentaires du chirurgien-dentiste

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

| | <i>Milieux de culture</i> | <i>Aspect de colonies</i> | <i>Aspect microscopique + coloration de Gram</i> | <i>Type respiratoire</i> |
|----------------------------------|---------------------------|---|--|----------------------------|
| Bactéries à Gram positifs | | | | |
| S1 | Gélose au sang | Colonie blanche, α hémolytiques | diplocoques capsulé ou en courte chaînette, Gram+, immobiles, | aero-anaerobie facultatifs |
| S2 | Gélose au sang | Petite colonies blanchâtre, β hémolytiques | Cocci, Gram+ en chaînette, immobile | aero-anaerobie facultatifs |
| S3 | BEA | Petite colonies grise avec noircissement de milieu (esculine +) | Catalase-, Cocci, Gram+, en chaînette, immobile, | aero-anaerobie facultatifs |
| S4 | BEA | Petite colonies grise à gris avec noircissement de milieu | Diplocoques et courte chaînette, Gram +, immobile, Culture en NaCl (65g/l) | aero-anaerobie facultatifs |
| S5 | BEA | Petite colonies grise avec noircissement de milieu (esculine +) | Diplocoques et courte chaînette, Gram +, immobile, Culture en NaCl (65g/l) | aero-anaerobie facultatifs |
| S6 | BEA | Petite colonies grise sans halo noir | Cocci, Gram + en chaînette, immobile | aero-anaerobie facultatifs |
| S7 | Chapman | Petite colonies blanche | Coque en amas, Gram + | aerobie stricte |
| S8 | Chapman | Petite colonies blanche | Coque en amas, Gram +, immobile | aero-anaerobie facultatifs |
| S9 | Chapman | Petite colonies saumon+virage de couleur en jaune | Coque en amas, Gram +, immobile | aero-anaerobie facultatifs |
| S10 | MRS | Petite colonies blanche | Bacille de taille moyenne, Gram +, immobile, | aero-anaerobie facultatifs |
| S11 | Tinsdale | Colonies moyenne, blanche | Bacille, Gram +, présence d'endospore | aero-anaerobie facultatifs |
| | Gelose Mossel | Colonies moyenne rose | | |
| S12 | Hectoen | Petite colonies jaune saumon | Bacille, Gram-, mobile | |
| | Mac Conkey | Petite colonies violet foncé | | |

| | | | | |
|------------|-------------------------------------|---|------------------------------------|----------------------------|
| S13 | Hectoen | Colonies moyenne, saumon+virage de milieu vert en jaune | Bacille, Gram-, mobile, | aero-anaerobie facultatifs |
| S14 | EMB | Petite colonies colonies violés | Bacille, Gram-, mobile, | aero-anaerobie facultatifs |
| S15 | EMB | Petite colonies brunâtres, muqueuses | Bacille, Gram-, immobile | aero-anaerobie facultatifs |
| S16 | EMB | Petite colonies brunâtres, muqueuses | Bacille, Gram-, immobile | aero-anaerobie facultatifs |
| S17 | EMB | Petite colonies brunâtres, muqueuses | Bacille, Gram-, immobile | aero-anaerobie facultatifs |
| S18 | Gelose au sang | Petite colonies noir | Bacille, Gram- | Anaerobie stricte |
| S19 | Gelose au sang | Petite colonies blanche | Coque, Gram - | anaerobie stricte |
| S20 | Gelose au sang | Petite colonies blanche, crémeuse | Coque, Gram - | aérobies strictes |
| S21 | Gelose au Cetrimide | Petite colonies transparente présentant une fluorescence sous rayonnement à 360 nm, | Bacille, Gram-, mobile | aerobie stricte |
| S22 | Gelose au Cetrimide | Petite colonies blanche | Bacille, Gram-, mobile | aerobie stricte, |
| S23 | EMB | Petite colonies rose-violet avec un reflet methalique | Bacille, Gram-, mobile, | aero-anaerobie |
| S24 | Sabouraud+ actidione | Colonies blanches de 1-2mm de diamètre, crémeuses, à odeur caractéristique | Présence de levures avec bourgeons | |
| S25 | Sabouraud | Petite colonies blanches | Présence de levures avec bourgeons | |
| S26 | Sabouraud+gentamicine+chlamphénicol | Petite colonies blanches | | |

| | | API Candida | | | | | | | | | |
|------------|-------------------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|--------------|-------------|--------------|--------------|------------|
| | | GLU | GAL | SAC | TRE | RAF | B MAL | αAMY | B XYL | B GUR | URE |
| S24 | <i>Candida albicans</i> | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - |
| S25 | <i>Candida sp.</i> | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - |
| S26 | <i>Sccharomyces sp.</i> | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |

La coloration de Gram

- Le frottis est séché puis fixé est recouvert d'un premier colorant (Violet de gentiane ou cristal violet) pendant 1mn.
- Toutes les bactéries prennent ce colorant .On recouvre alors de réactif de Lugol (iode+iodure de potassium) qui joue le rôle de mordant.
- Après 30 secondes le frottis est soumis à l'action de l'alcool à 95% pendant 10secondes puis laver la lame par l'eau distillé.
- L'alcool, en dissolvant le violet de gentiane permet la décoloration de certaines bactéries dites à gram négatif.
- Les bactéries gram positif conservant leur couleur violette.
- La préparation est recouverte d'une deuxième colorant (fuchsine basique ou safranine) qui recolore en rose les bactéries précédemment d décolorées par l'alcool.

Milieux de culture

BEA (gélose) : gélose bile azide esculine

| | |
|---------------------------------|--------|
| Peptone trypsique..... | 17g |
| Peptone pepsique de viande..... | 3g |
| Extrait de levure..... | 5g |
| Bile de bœuf déshydratée..... | 10g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Citrate de sodium..... | 1g |
| Esculine..... | 1g |
| Citrate de fer ammoniacal..... | 0.5g |
| Azide de sodium..... | 0.25g |
| Gélose..... | 13g |
| Eau distillée | 1000ml |
| pH 7. Autoclaver 15 mn à 120°C | |

MRS (gélose)

| | |
|--|--------|
| Peptone de viande | 10g |
| Extrait de viande..... | 10g |
| Extrait de levure..... | 5g |
| Glucose..... | 20g |
| Tween 80..... | 01ml |
| Phosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄)..... | 2g |
| Acetate de sodium..... | 5g |
| Citrate triammoniaque..... | 2g |
| Sulfate de magnésium..... | 200mg |
| Sulfate de manganese..... | 50mg |
| Gélose..... | 15g |
| Eau distillée..... | 1000ml |
| pH = 6.5 Autoclaver 15 mn à 120°C | |

Gélose Columbia (Bio Mérieux)

| | |
|---------------|----|
| Peptone..... | 5g |
| Tryptone..... | 5g |

| | |
|---------------------------------|--------|
| Peptone de soja..... | 3g |
| Extrait de levure..... | 3g |
| Cœur cerveau..... | 8g |
| Amidon..... | 1g |
| Chlorure..... | 5g |
| Agar..... | 20g |
| Eau distillée..... | 1000ml |
| pH 7.3 Autoclaver 15 mn à 121°C | |

Mueller Hinton(Bio Mérieux)

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Extrait de viande..... | 3g |
| Hydrolysate acide de caseine..... | 17.5g |
| Amidon..... | 1.5g |
| Agar..... | 16g |
| Eau distillée..... | 1000ml |
| pH 7.3 Autoclaver 15mn à 121°C | |

Bouillon Cœur cervelle

| | |
|--|-------|
| Protéose peptone..... | 10g |
| Infusion de cervelle de veau..... | 12.5g |
| Infusion de cœur de bœuf..... | 5g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Phosphate disodique..... | 2.5g |
| Glucose..... | 2g |
| pH 7.4 Répartie en tubes à essais (9à 10ml), Autoclaver 15mn à 120°C | |

Gélose au cœur cerveau (Bio Mérieux)

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Cœur cerveau infusion | 37g |
| Agar..... | 18g |
| Eau distillée..... | 1000ml |
| pH 7.4 ± 0.2 Autoclaver 15mn à 121°C | |

Gélose Mannitol mobilité (Bio Mérieux)

| | |
|--------------------------------|-------|
| Extrait de viande..... | 3g |
| Peptone..... | 15g |
| Mannitol..... | 10g |
| Nitrate de potassium..... | 1g |
| Rouge de phénol..... | 0.05g |
| Agar..... | 4g |
| pH 7.8 Autoclaver 15mn à 121°C | |

Gélose Hektoen

| | |
|--------------------------------|------|
| Protéose peptone | 12g |
| Extrait de levure..... | 3g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Thiosulfate de sodium..... | 5g |
| Sel biliaires..... | 9g |
| Citrate de fer ammoniacal..... | 1.5g |
| Salicine..... | 2g |

| | |
|---|--------|
| Lactose..... | 12g |
| Saccharose..... | 12g |
| Fuschine acide..... | 0.1g |
| Bleu de bromothymol..... | 65mg |
| Gélose..... | 13g |
| Eau distillée..... | 1000ml |
| pH 7.6 Stériliser par 5mn d'ébullition (ne pas autoclaver). | |

Bouillon nutritif-

| | |
|--------------------------------|--------|
| Extrait de viande..... | 5g |
| Peptone..... | 10g |
| Chlorure de sodium..... | 5g |
| Eau distillée | 1000ml |
| pH 7.2 Autoclaver 15mn à 121°C | |

Chapman (milieu de Chapman gélatine)

| | |
|------------------------------------|--------|
| Extrait de levure..... | 2.5g |
| Peptone de caséine..... | 10g |
| Gélatine..... | 30g |
| Lactose..... | 2g |
| Mannitol..... | 10g |
| Chlorure de sodium..... | 75g |
| Phosphate dipotassique..... | 5g |
| Gélose..... | 12g |
| Eau distillée..... | 1000ml |
| pH 7. Autoclaver 15mn à 120°C..... | |

EMB (gélose lactosée)

| | |
|--------------------------------|------|
| Peptone..... | 10g |
| Lactose..... | 10g |
| Phosphate bipotassique..... | 2g |
| Eosine..... | 0.4g |
| Bleu de méthylène..... | 65mg |
| Gélose..... | 15g |
| pH 7.1. Autoclaver 15mn à120°C | |

Gélose viande foie (VF).

| | |
|-------------------------------|-----|
| Extrait viande –Foie..... | 10g |
| Peptone..... | 20g |
| Extrait de levure..... | 10g |
| Glucose..... | 5g |
| Gélose..... | 15g |
| pH 7.6 Autoclaver 15mn à120°C | |

Bouillon de sabouraud

| | |
|--------------------------------|-----|
| Peptone de viande | 5g |
| Peptone de caseine..... | 5g |
| Glucose..... | 20g |
| pH 7.6 Autoclaver 15mn à120°C. | |

MESURIM est un logiciel destiné à faire différents types de travaux sur les images numérisées :

- Annotation et retouche sommaires de l'image.
- Colorisation.
- Réalisation d'un schéma.
- Repérage d'une position (pour des graphiques comportant des axes).
- Comptage d'éléments de l'image.
- Mesure de longueur, de lumière ou de surface.
- Utilisation de différents types de codes de couleurs.

Ce logiciel, réalisé par Jean-François Madre, est distribué gratuitement sur internet :

<http://acces.ens-lyon.fr/acces/logiciels/mesurim/telechargement>

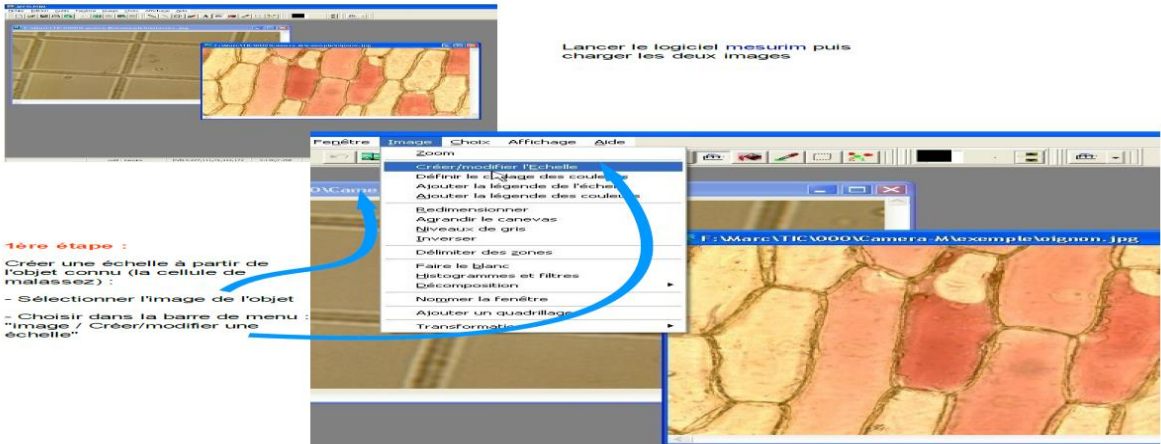
ACQUISITION D'IMAGE : Créer une échelle avec Mesurim

Il s'agit, grâce au logiciel **Mesurim**, de fournir une échelle pour une photographie réalisée sous microscope.

Pour cela il est nécessaire de réaliser dans les mêmes conditions d'observation (même grossissement), une photographie d'une préparation dont les dimensions sont connues.

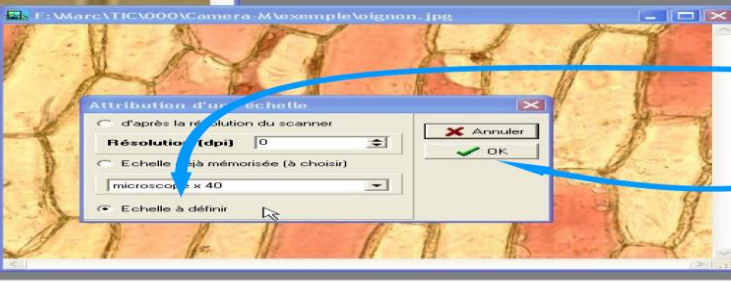
Dans cet exemple, on cherche la taille réelle des cellules de l'épiderme d'oignon rouge en s'appuyant sur les dimensions de la cellule de Malassez.

Lancer le logiciel mesurim puis charger les deux images




1ère étape :
Créer une échelle à partir de l'objet connu (la cellule de Malassez) :

- Sélectionner l'image de l'objet
- Choisir dans la barre de menu : "Image / Créer/modifier une échelle"



Choisir "Echelle à définir"
Puis valider "OK"



Choisir "longueur" comme type d'échelle (échelle identique pour les axes X et Y)
Puis valider "suite"

Création de l'échelle associée à une image

Tracer un trait de longueur connue et indiquer ci-dessous sa longueur et l'unité

Échelle de longueur

Retour OK

valeur : 100 unité : µm

début du segment : X1 0 Y1 0

fin du segment : X2 100 Y2 0

Définir la valeur et l'unité de la dimension de l'objet

Création de l'échelle associée à une image

Tracer un trait de longueur connue et indiquer ci-dessous sa longueur et l'unité

Échelle de longueur

Retour OK

valeur : 100 unité : µm

début du segment : X1 0 Y1 0

fin du segment : X2 100 Y2 0

Pointer avec la souris puis tirez pour définir la longueur de référence (2 cases correspondent à 100 µm)

Puis valider "OK"

On peut changer la couleur du trait pour une meilleure visibilité

Abandon Couleur

Choisir le mode sauvegarde :

- "ne pas garder en mémoire" attribue l'échelle uniquement à l'image pour laquelle elle a été définie
- "ajout temporaire" permet d'appliquer cette échelle à différentes images mais ne sera pas conservée une fois le logiciel fermé
- "enregistrer dans le fichier" permet de sauvegarder, sur le disque dur, l'échelle : elle est donc réutilisable pour d'autres sessions.

Non de l'échelle

Ne pas garder en mémoire

Ajouter à la liste des échelles standard

Ajout temporaire

Enregistrer dans le fichier

Taper le nom choisi

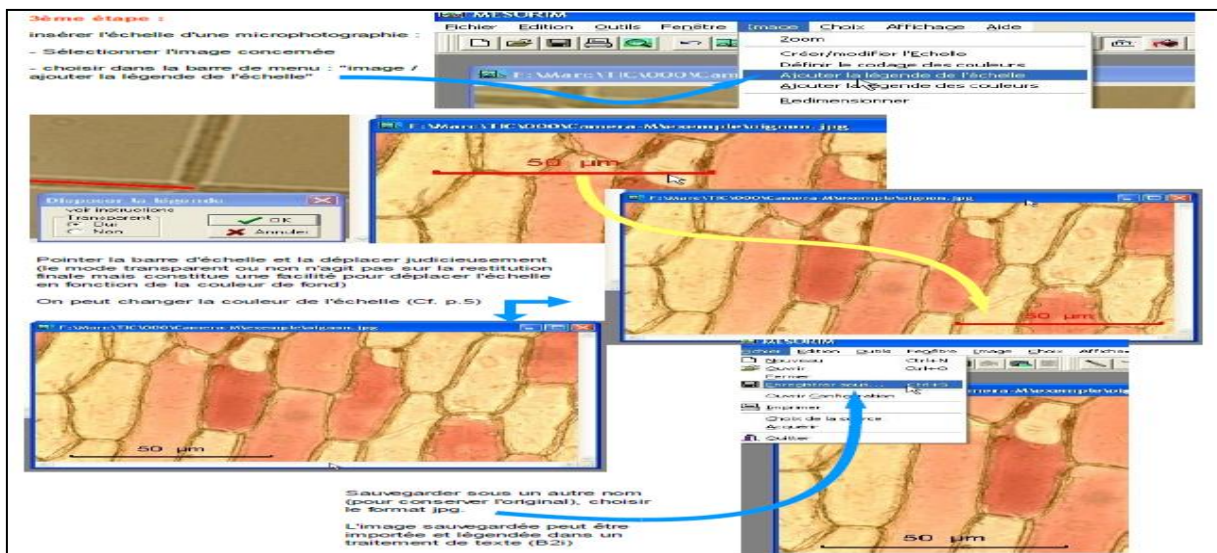
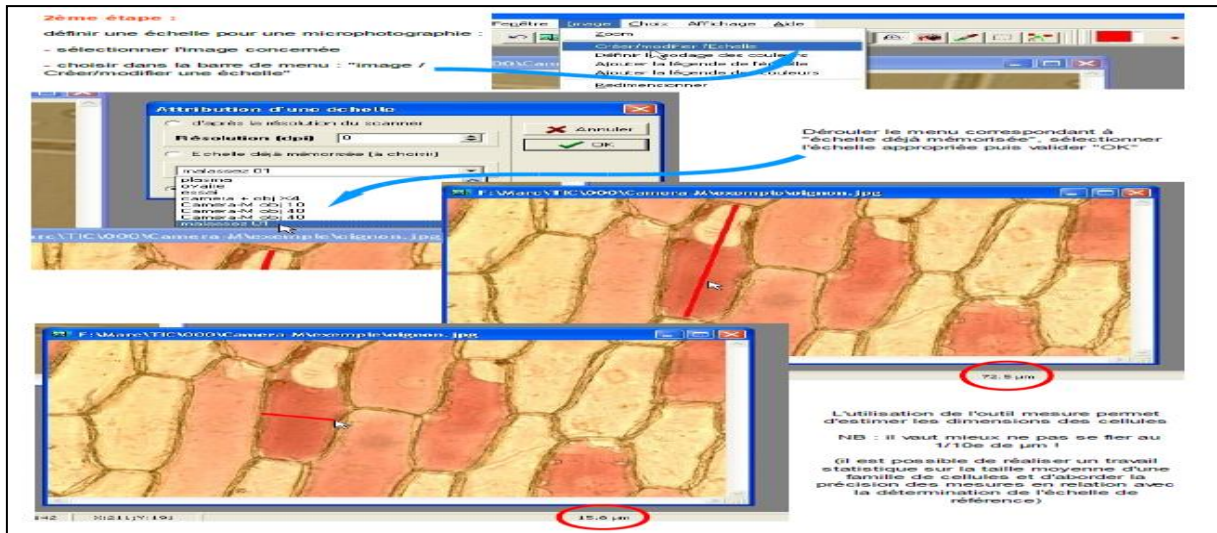
Indice(s) 01

F:\Marc\TIC\000\Camera-M\exemple\analysez.jpg

VBL5:132,111 24,307,131 X:151,Y:234

50.3 µm

L'utilisation de l'outil mesure (outil par défaut quand on lance Mesurim) permet d'obtenir les longueurs (pointer et tirer comme pour la définition de l'échelle)





L'huile essentielle



Extrait methanolique
Les extraits de *N.sativa*

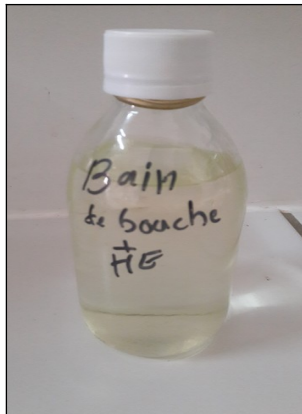
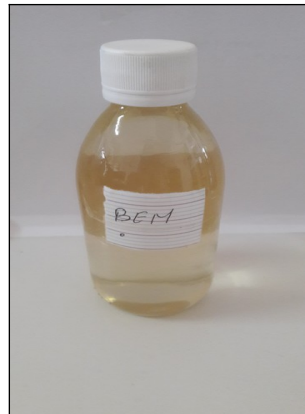


NEsHE

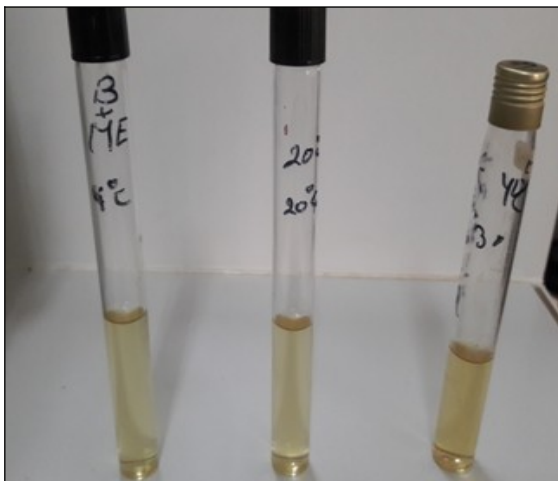


NEsEM

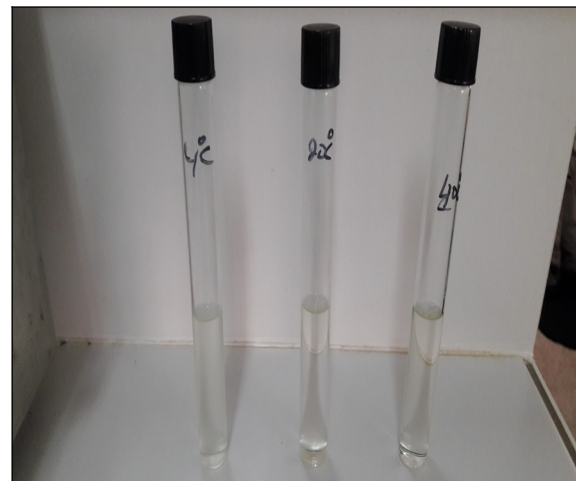
Nanoemulsion de *N.sativa*



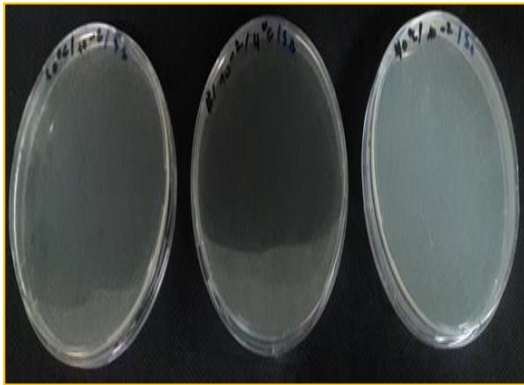
Nanoemulsion de *N.sativa*



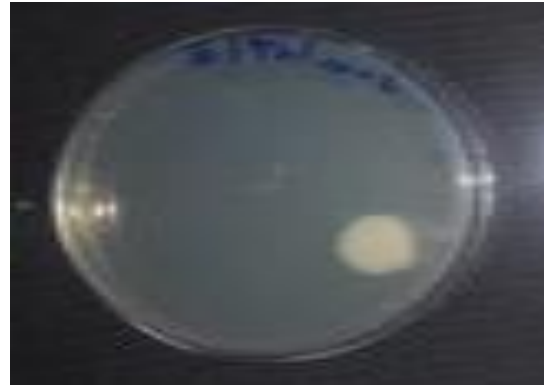
NEsEM conservé à 4°C, 20°C, 40°C
(60jours)



NEsHE conservé à 4°C, 20°C, 40°C
(60jours)



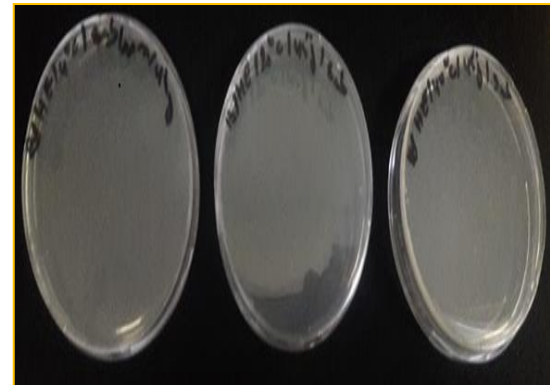
Dénombrement de la flore totale de *NEsHE* conservée à 4°C, 20°C, 40°C (7jours)



Dénombrement de la flore totale de *NEsEM* à t=0



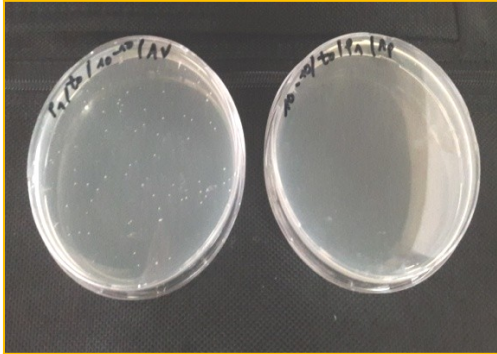
Dénombrement de levure et moisissures de *NEsHE* conservée à 4°C, 20°C, 40°C (15jour)



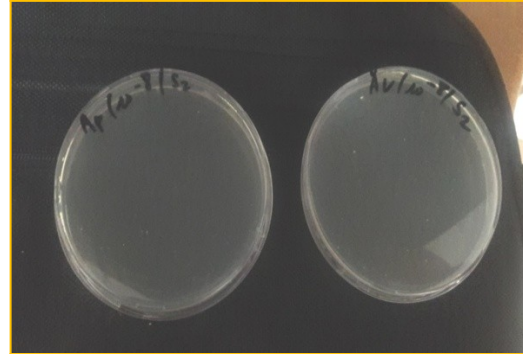
Dénombrement des levures et moisissures de *NEsEM* conservée à 4°C, 20°C, 40°C (45jour)



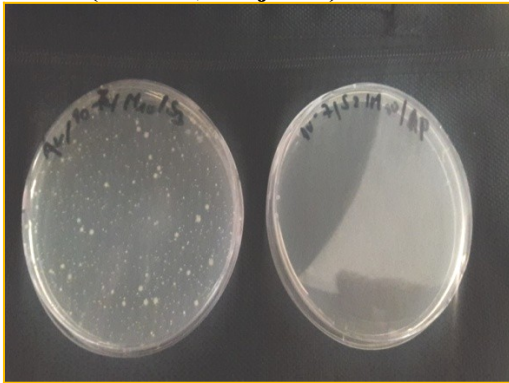
Dénombrement de la flore totale de *NEsEM* conservée à 4°C, 20°C, 40°C (45jour)



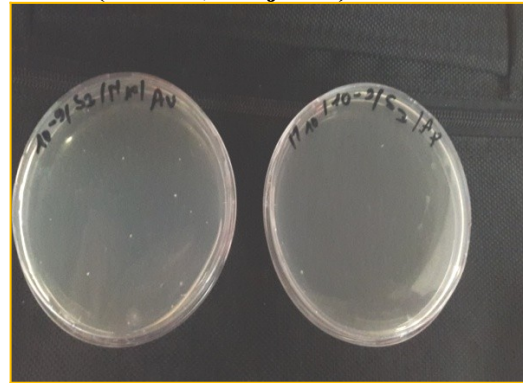
Patient 1 : Dénombrement de la flore totale (*in vivo* ; 1^{ier} jours)



Patient 1 : Dénombrement de la flore totale (*in vivo* ; 14^r jours)



Patient 10 : Dénombrement de la flore totale (*in vivo* ; 21 jours)



Patient 10 : Dénombrement de la flore totale (*in vivo* ; 21^r jours)

Effet de NEsHE sur la flore totale (*in vivo*)



ORIGINAL ARTICLE

In vitro study on the activity of essential oil and methanolic extract from Algerian *Nigella sativa* L. Seeds on the growth kinetics of micro-organisms isolated from the buccal cavities of periodontal patients



Fatima Zohra Kiari ^{a,b,*}, Boumediene Meddah ^b, Aicha Tir Touil Meddah ^b

^a Research on Biological Systems and Geomatics Laboratory, Mustapha Stambouli University, P.O. Box 305, Mascara, Algeria

^b Laboratory of Bioconversion, Microbiological Engineering and Health Security, Mustapha Stambouli University, Mascara, Algeria

Received 15 March 2017; revised 24 May 2018; accepted 31 May 2018

Available online 18 June 2018

KEYWORDS

Periodontal disease;
Nigella sativa L. essential oil;
Methanol extract;
Bactericidal/fungicidal kinetics;
Polyphenols;
Flavonoids

Abstract An *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of essential oil (EO) and methanol extract (ME) from Algerian *Nigella sativa* L. seeds against microbial strains isolated from the oral cavities of periodontal patients was performed. Twelve Gram-positive bacteria, eleven Gram-negative bacteria and three microscopic fungi strains were isolated and identified. The antimicrobial activities of EO and ME were tested against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* sp., *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, *Porphyromonas* sp., *Veillonella* sp., *Candida* sp. and *Saccharomyces* sp.. The total polyphenol and flavonoids contents of ME were higher than those of EO. Thin layer chromatography showed that catechin, gallic acid and quercetin were most likely present in the extracts. Fourier transform infrared spectrometry analysis (FT-IR) indicated the presence of bands from the CO groups of acids, alcohols, phenols, and ethers and the C=O band of aldehydes. Analysis of the antimicrobial activity of *N. sativa* extracts obtained by the microdilution method showed excellent bactericidal activity of the essential oil and moderate efficiency of the ME against all the microbes tested. *Staphylococcus epidermidis* and *Porphyromonas* sp. were the most sensitive to EO (minimum bactericidal concentration (MBC): 16,500 µg/ml) at 48 h of incubation and, 125,000 µg/ml of ME was the most active against all the microbes tested. However, after 18 or 24 h, this efficiency was

* Corresponding author at: Laboratory of Bioconversion, Microbiological Engineering and Health Security, Mustapha Stambouli University, Mascara, Algeria.

E-mail address: kiarifatimabio@gmail.com (F.Z. Kiari).

Peer review under responsibility of King Saud University.



Production and hosting by Elsevier

<https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.05.011>

1013-9052 © 2018 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

decreased in some strains. In addition, *Saccharomyces* sp. and *Candida albicans* were more sensitive to EO than ME during the incubation, while this efficiency was clearly not visible with the agar well method, and most microbes tested presented remarkable resistance to these extracts.

© 2018 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

The oral flora consists of a complex ecosystem, and more than 700 bacterial species have been identified (Aas et al., 2005). It comprises Gram-positive and Gram-negative bacteria that can be facultatively anaerobic or strictly anaerobic (INSERM, 1999) living normally in an ecological balance state. However, an imbalance may encourage (stimulate) the appearance of pathology (gingivitis and periodontitis) (Mayrand and Grenier, 1998). Gingivitis is defined as the result of a non-specific inflammatory reaction caused by an increase in the amount of bacteria (Gram-positive or Gram-negative) at or below the marginal gingival level (Gendron et al., 2000). Periodontitis is an inflammatory lesion caused by bacterial infection that destroys the supporting tissues of the tooth (Silva et al., 2015; Holt and Bramanti, 1991). These pathologies are influenced by several factors, including smoking, sex hormones, drug intake, systemic diseases, allergic or infectious skin diseases and human immunodeficiency virus HIV (Mariotti and Hefti, 2015; Kinane, 2001; INSERM, 1999) and can be the result of some dominant bacterial pathogens acting on other bacteria species (Mayrand and Grenier, 1998). The infectious nature of most periodontal diseases and the limited results from conventional mechanical therapy justify the occasional use of antibiotics, which causes some risks, such as the development of resistance in various bacterial species (Bidault et al., 2007). Consequently, the search for alternative products isolated from plants used in traditional medicine is considered a good alternative to synthetic chemical treatments. *Nigella sativa* L. is a promising medicinal plant. It is a dicotyledon of the *Ranunculaceae* family that has angular and small sized seeds that are dark grey or black colour that is grown in Mediterranean Sea countries, such as Pakistan, India and Iran (Padhye et al., 2008). These plants are commonly known as black seed (English), Al-Habba Al-Sawdaa (Al-Gaby, 1998), and ‘Senouj’ in Algeria (Cheikh-Rouhou et al., 2007). It is frequently used as a spice and preservative in bread, pickles and other dishes (Aljabre et al., 2005) and has been traditionally used in Middle Eastern folk medicine as a natural remedy for various diseases for over 2000 years (Phillips, 1992). It is widely used in Arab and Islamic countries in traditional medicine for the treatment of diabetes, hypertension, bronchial pulmonary disorders, gastrointestinal disorders, various infections, inflammation and allergies. These therapeutic efficacies were recently proven by pharmacological and biological studies (Orsi-Llinares, 2005). *Nigella sativa* L. was also one of the valuable remedies provided by the personal physician of the pharaohs for digestive action after large meals and to treat headaches and toothaches (Toparslan, 2012). The black seed occupies an important place in Islamic civilization, as the Prophet Muhammad (peace be upon him) said “El Habbahsauda is a drug for all diseases except death”, and IbnSina (980-1037) cited the therapeutic effects of black seeds in his book “Kitab

al-Shifa” (Toparslan, 2012). For these traditional uses of *Nigella* seeds, to valorise this plant in the pharmaceutical field, an *in vitro* study was carried out to determine the effect of the essential oil and methanol extract of Algerian *N. sativa* on the growth of micro-organisms isolated from the buccal cavity of periodontal patients.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Nigella sativa seeds were collected from Qsar Admor-Konta, Adrar-Algeria and identified by a plant botanist from Mustapha Stambouli University in Mascara, Algeria. The seeds were sorted and stored in clean bags for protection from light and moisture. The tested dry extract of *N. sativa* seeds was 2% \pm 0.35 (Fig. 1).

2.2. Preparation of the extracts

2.2.1. Isolation of the essential oil

Thirty grams of *N. sativa* seeds was crushed into powder using an electric crusher (IKA WERKE M20) and submitted to *ex situ* steam distillation (Blanchaud-desce et al., 1987) for 90 min. After salting the distilled water, the essential oil (EO) was collected in n-hexane using liquid–liquid extraction. The traces of water in the organic phase were dried with a small amount of anhydrous sodium sulphate, concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator at 40 °C and stored in sterile small glass tubes at –4 °C. The EO yield was estimated according to the total mass of the dry powder seeds.

2.2.2. Preparation of methanol extract

The methanol extract (ME) was extracted by the method provided by Houcher et al. (2007) modified in our laboratory. Fifty grams of seeds was ground into powder and soaked in 500 ml of 80% aqueous-methanol (1/10, w/v) for 24 h at room temperature. After filtration, the methanol extract (ME₁) was concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator at 40 °C until all the solvent was removed. A second extraction with residue and 50% aqueous-methanol (1/10 = w/v) was carried out for 24 h.

After filtration and concentration of the second extract (ME₂), the two extracts were combined and stored in sterile small bottles (10 ml) at –40 °C until further use. The total crude methanol extract yield (ME) was estimated according to the total mass of the dry powder seeds.

2.3. Extracts analysis by thin layer chromatography

To ensure chromatographic separation of various chemical constituents of the extracts, we filed a drop of each prepared



Fig. 1 Saharian *Nigella sativa* (Adrar, Algeria).

extract and standard substances on silica gel plates (stationary phase). We used different mobile phases for each extract (Table 1). The uncoloured spots were detected with short wave UV (366 nm), and the relative migration rates (R_fs) of different molecules were calculated (Touchstone and Dobbins, 1983).

2.4. Determination of total polyphenol content

Total poly phenol contents in the EO and ME of *N. sativa* seeds was determined with the Folin–Ciocalteu reagent according to the method described by Bourgou et al. (2008). In a test tube, 0.125 ml of Folin–Ciocalteu's reagent (diluted 10%) was added to 0.5 ml of distilled water and 0.125 ml of diluted extract (or a standard solution of gallic acid (166 µg/ml) and it binary dilutions). The mixture was incubated for 3 min at room temperature, and 1.52 ml of Na₂CO₃ solution (7%) was then added. Finally, the volume was increased to 3 ml using distilled water. The solution was mixed by vortexing and incubated in the dark for 90 min at ambient temperature. Absorbance of the solution was measured at 760 nm against a blank solution using a spectrophotometer. The concentrations

of the total phenolic compounds in each extract were calculated from the calibration curve of the gallic acid standard and expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of extract. All determinations were performed in duplicate.

2.5. Determination of total flavonoid content

In a 10 ml flask, 4 ml of distilled water was mixed with 1 ml of diluted extract (or a standard catechin solution (266 mg/L) and it binary dilutions), and 0.3 ml of NaNO₂ (5%) was subsequently added. After five minutes, 0.3 ml of AlCl₃ (10%) was added, and the mixture was incubated for six minutes at room temperature. Then, 2 ml of NaOH (4%) was added, and the total volume (10 ml) was immediately comprised with distilled water. After 15 min of incubation, the mixture was thoroughly stirred, and the absorbance was read against a blank at 510 nm (Salem et al., 2013a). The flavonoid contents were expressed as milligrams of catechin equivalent (CE) per gram of extract.

2.6. Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR) analyses

Infrared spectrometry is used to identify various secondary metabolite groups in plants. It is based on the excitation of molecules by infrared radiation and the energy of molecular vibration changes, both of which represent the states of molecule rotation and vibration (Bertrand and Dufour, 1987). In the present study, the powder of *N. sativa* seeds, extracts and residues of extraction were characterized by the Fourier transform infrared spectrometry method (FT-IR-Agilent Type, Technologies Laboratory LMAE). The transmittance spectra were recorded at room temperature in the 4000–400 cm⁻¹ range.

2.7. In vitro antimicrobial activity of essential oil and methanol extract

2.7.1. Clinical examination

The microbial strains used in this study were isolated from the oral cavities of 12 patients (4 men, 8 women) between 16 and 75 years of age that were suffering from periodontal diseases. These patients were selected after a questionnaire and a clinical examination (Periodontal Index, Gingival Index, Oral Hygiene Index, Plaque Index) (INSERM, 1999; Wei and Lang, 1982) by dentists from the health centre of Mehor Meheidine in Mascara, Algeria.

Table 1 Mobile phases of thin layer chromatography.

| Extract | Mobile phase |
|----------|---|
| 1 EO | Toluene-methanol (95:5 v/v) |
| 2 EO | Diethyl ether – n-hexane (1:1 v/v) |
| 3 EO | Ethyl acetate – acetone – formic acid – distilled water (5:3:1:1 v/v/v/v) |
| 4 EO, ME | Hexane – Diethyl ether – acetone (40:10:1.5 v/v/v) |
| 5 EO, ME | Acetone-hexane (1:2 v/v) |
| 6 EO, ME | Hexane – Diethyl ether – methanol (40:10:1.5 v/v/v) |
| 7 EO, ME | Chloroform – Ethyl acetate – formic acid (50:40:10 v/v/v) |
| 8 EO, ME | Hexane-acetone – Diethyl ether – methanol – distilled water (1:1:1:1 v/v/v/v/v) |
| 9 ME | Toluene – Ethyl acetate – formic acid (5:4:1 v/v/v) |
| 10 ME | Ethyl acetate – methanol – distilled water (77:13:10 v/v/v) |
| 11 ME | Hexane – methanol-distilled water-acetone (1:1:1:1 v/v/v/v/v) |

EO: essential oil; ME: Methanol extract, v: volume.

2.7.1.1. *Periodontal index (PI)* (Russel, 1956). The periodontal index is an assessment system applied to each tooth with the following values:

- 0 = healthy tooth to periodontal
- 1 = gingival inflammation around a portion of the tooth
- 2 = gingival inflammation surrounding the tooth
- 6 = formation of a pocket
- 8 = loss-of-function by excessive mobility

2.7.1.2. *Gingival index (GI)* (Loe and Silness, 1963). Four degrees of gingival inflammation were evaluated:

- 0 = no inflammation
- 1 = inflammation without bleeding
- 2 = inflammation causing bleeding
- 3 = ulceration and spontaneous bleeding

2.7.1.3. *Oral Hygiene Index (OHI)* (Greene and Vermillion, 1960). This index comprises two distinct components: the debris index and the calculus index.

The debris index (DI) measures the coronary extension of soft deposits to the first, second or last third of the buccal or lingual surfaces of the teeth:

- 0 = no debris
- 1 = 1/3 of the surface is covered with debris
- 2 = 2/3 of the surface is covered with debris
- 3 = more than two-thirds of the exposed tooth surface is covered with debris

The calculus index (CI) measures the corresponding coronal extent of subgingival calculus in the form of isolated or deposits in a continuous strip:

- 0 = no calculus present
- 1 = 1/3 of the face is covered with calculus
- 2 = 2/3 of the face is covered with calculus
- 3 = entire face is covered with calculus

OHI is the total of the DI and CI.

2.7.1.4. *Plaque Index (PII)* (Silness and Loe, 1964). This index measures the thickness of the plaque in each of the four dental faces. The maximum number of patients is $28 \times 4 = 112$ dental faces.

- 0 = no plaque in the gingival area
- 1 = a film of plaque adhering to the free gingival margin and adjacent area of the tooth
- 2 = moderate accumulation of soft deposits within the gingival pocket, on the gingival margin and/or adjacent tooth surface, which can be seen by the naked eye
- 3 = abundance of soft matter within the gingival pocket and/or on the gingival margin and adjacent tooth surface

2.7.2. *Microbiological sampling*

After rinsing the mouth with sterile distilled water, supragingival plaques were removed by sterile swabs moistened with physiological saline solution, while subgingival plaques were collected on a Gracey curette inserted into the periodontal pocket. The samples were placed in sterile tubes and immediately transported to the laboratory (Yacoubi et al., 2010; Colombier et al., 2006).

2.7.3. *Microbial strains*

After an enrichment of levies in Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Denis et al., 2007), Gram-positive bacteria were isolated by the streak plate method on Agar Chapman, Bile Esculin Agar (BEA), De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS), and Comombia Agar with 5% sheep blood media, while Gram-negative bacteria were isolated on Hecktoen Agar, Eosin Methylene blue Agar (EMB), Brain Heart Infusion (BHI), Mac Conkey Agar and Colombia Agar with 5% sheep blood. Facultative anaerobic bacteria were incubated under normal atmospheric conditions at an optimum temperature of 37 °C for 24–72 h, and strictly anaerobic bacteria were incubated in an anaerobic jar at 37 °C for 3–7 days. Microbial culture conditions, macroscopic characteristics (colony appearance, size, colour) and microscopic observations (bacterial form, Gram coloration) were supplemented with conventional biochemical tests (catalase, oxidase, mannitol, mobility, o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG), coagulase, citrate, Kligler-Hajna, endospore stain) (Denis et al., 2007; Brossard et al., 2006; Djelouat, 1990; Leyral, 1973). Finally, bacteria identification diagrams of the main groups (Gram-positive bacilli, Gram-negative Bacilli & cocci, Gram-positive cocci, Gram-negative anaerobic bacilli) were used to guide the bacterial identification (Leyral and Joffin, 1998), and different miniaturized multi-test systems of API Staph (*Staphylococcus*, *Micrococcus*), API 20Strep (*Streptococcus*, *Enterococcus*), API 20E (*Enterobacteriaceae* and other Gram-negative bacilli bacteria), API 20NE (Gram-negative bacilli, no *Enterobacteriaceae*), and API 20A (strictly anaerobic bacteria) were applied according to the BioMerieux manual (Leyral and Joffin, 1998) to complete the identification of the microbes. Microscopic fungi were isolated on Sabouraud chloramphenicol gentamicin at 25 °C for 3–5 days and identified by API 20Candida. For preservation of the bacterial and microscopic fungi strains at –20 °C, nutrient and sabouraud broths with 12% glycerol were used successively.

2.7.4. *Inoculum preparation*

Microbial strains were thawed and inoculated in nutrient agar at 37 °C for 18 h, and one colony from each culture was subsequently diluted in nutrient broth to adjust the suspension to a final density of 10^8 UFC/ml at 620 nm (JENWAY, 6400 spectrophotometer).

2.7.5. *Preparation of N. sativa extracts solutions*

N. sativa extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, 99% purity) to prepare 33,000 µg/ml and 250,000

µg/ml EO and ME solutions, respectively, and the solutions were sterilized by filtration (0.22-µm filters).

2.7.6. Effect of essential oil and methanol extract on microbial growth kinetics

This test was performed by the microdilution method in sterile 96-well microplates according to the method provided by Salem et al. (2013a). Briefly, 50 µl of Mueller Hinton broth (for bacteria test) or Sabouraud broth (for yeast test) was placed into wells of the microplates. Subsequently, 50 µl of EO (33,000 µg/ml) or ME (250,000 µg/ml) was added to the first column of the microplates. Then, the serial dilution of each extract was prepared and added to each well. Fifty microlitres of microbial suspension was adjusted to 10^8 UFC/ml. The microplates were covered with sterile aluminium foil and incubated under normal atmospheric conditions (facultatively anaerobic microbes) and in anaerobic jars (anaerobic microbes) at 37 °C. Microbial growth was determined by reading the respective absorbance (Abs) at 620 nm on a microplate reader (TECAN SPECTRA) five times (at 0, 2, 18, 24, 48 h). One well with specific medium (50 µl) and the microbial suspension (50 µl) was used as the growth control. Another well was inoculated with specific medium to assess the sterility and aseptic work conditions, and a negative control was prepared using DMSO. The microbial tests were prepared in triplicate.

2.7.7. Agar well diffusion assay

The antimicrobial effect of *N. sativa* extracts was tested according to the Abu-Al-Basal (2009) method modified in the laboratory. After the solidification of Mueller Hinton agar in Petri dishes (9 cm diameter), three wells 4 mm in diameter were cut in each dish. One hundred microlitres of diluted microbial suspension (10^8 UFC/ml) was inoculated on agar. The inocula were allowed to dry for 15 min. Then, 50 µl of different concentrations of EO (16,500 µg/ml and 8250 µg/ml) or ME (125,000 µg/ml and 62,500 µg/ml) was added separately to each well of the agar. DMSO was also used as a negative control. The Petri dishes were incubated under normal atmospheric conditions (facultatively anaerobic microbes) and in anaerobic jars (anaerobic microbes) at 37 °C for 18 h, and the diameters of the zones of inhibition were measured in millimetres (mm). All tests were carried out in triplicate.

3. Statistical analysis

All growth kinetics and agar well tests were performed in triplicate. The results are expressed as the mean \pm SD. For microbial growth, a difference of 1 log UFC/ml (a microbiological standard) between the two times was considered significant (* $P \leq 0.05$) (Molly et al., 1993).

4. Results

The relative yields (% w/w) of the EO and ME in *N. sativa* seeds were $0.45\% \pm 0.028$ and $10.9 \pm 1\%$, respectively. The EO was yellow to orange colour with aromatic characteristics. The ME had a patty appearance, characterized by a dark brown to black colour and a strong and specific odour.

4.1. Thin layer chromatography results

The results obtained show that the mobile phases hexane – diethyl ether – methanol (40:10:1.5 v/v/v) and chloroform – ethyl acetate – formic acid (50:40:10 v/v/v) are the most suitable for the separation of EO and ME molecules. Following observation under UV light (336 nm), compared with the relative migration rate (Rf) of separated spots and control components, we deduced that catechin, gallic acid and quercetin are probably present in the EO and ME, whereas ellagic acid and vanillin are present in EO and ME, respectively (Table 2).

4.2. Total phenolics and flavonoids contents

Preliminary phytochemical screening indicated the presence of phenolic compounds and flavonoids in the ME (El-Agbar et al., 2008), and this present study shows that ME has higher total phenol and flavonoid contents (28.1 ± 3.5 mg GAE/g extract and 5.64 ± 0.4 mg CE/g extract) than EO (15.75 ± 2 mg GAE/g extract and 2.150 ± 0.5 mg CE/g extract).

4.3. Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR) results

The FT-IR spectra of EO, ME and the powder seeds before and after extraction are given in Fig. 2(a–e). In the overall reading of all spectra, the average band elongations at 2925 cm^{-1} and 2854 cm^{-1} resulted in aliphatic CH (in an aromatic methoxyl group, in methyl and methylene side chains) and aromatic CH, respectively. The bands observed in all spectra at 1041 cm^{-1} and 1462 cm^{-1} may be attributed to the stretching band in the CO group of the acid, alcohol, phenol, ether or ester groups. In the region of $1300\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$, several absorption bands were observed corresponding to a stretching band of CN vibration bands, and a peak was observed at 1600 cm^{-1} , which corresponds to a deformation in the NH group plan amides. The band at 1715 cm^{-1} indicates the presence of C=O stretching band aldehydes (Zawadzki, 1989). In the ME spectra, a large absorption band corresponding to OH observed at $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, maximizing at approximately 3300 cm^{-1} , which is characteristic of the vibration of elongation that can be attributed to alcohols or phenols, was intense because of the presence of water in the ME. The spectrum of powder seeds before and after extraction with methanol showed the presence of different absorption band intensities at 1715 cm^{-1} , indicating the presence of a stretching band

Table 2 The Rfs and Rt of extracts and witnesses.

| | Eluent 6 | Eluent 7 |
|-------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| Quercétrin | 0.09 | 0.45 |
| Gallic acid | 0.38 | 0.45 |
| élagic acid | 0.25 | 0.6 |
| Catéchine | 0.23 | 0.2 |
| Vanillin | – | 0.62 |
| Methanolic extract (ME) | 0.07; 0.10; 0.17; 0.23; 0.375; 0.826 | – |
| Essential oil (EO) | 0.1 0.22; 0.26; 0.34; 0.36; 0.76; 0.9 | 0.13; 0.19; 0.34; 0.48; 0.63 |

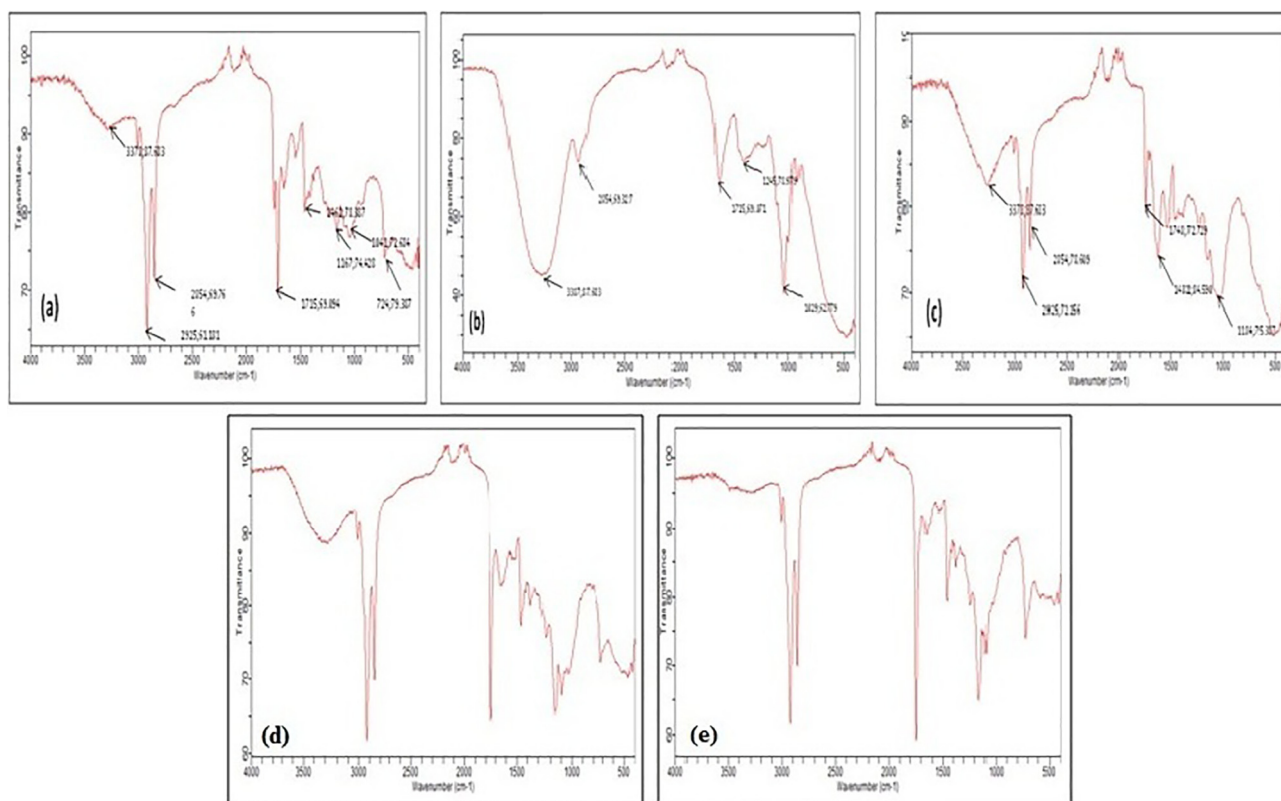


Fig. 2 FT-IR results of *N. sativa*: (a) fine powder of the seeds prior extraction: (b) ME, (c) residue extraction by maceration, (d) EO, (e) residue extraction by steam distillation.

corresponding to the C=O of aldehydes (Zawadzki, 1989) and a peak observed at 1700 cm^{-1} corresponding to the C=O group of esters and lactones. For the EO, in the region of $500\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, low bands were observed corresponding to a band stretching vibration of C=C-H. Another weak band was recorded at 2150 cm^{-1} , which corresponds to the C≡C group of alkynes.

4.4. Micro-organisms

Twelve Gram-positive bacteria, eleven Gram-negative bacteria and three microscopic fungi strains were isolated and identified from the oral cavities of periodontal patients (see Table 3). The microbial plaques of gingivitis consisted of Gram-positive facultative or strictly anaerobic bacteria, including the dominant species *Actinomyces* and *Streptococcus* in the supra and subgingival plaques. We can also isolated a low proportion of the strictly anaerobic Gram-negative bacilli bacteria (INSERM, 1999), while strictly anaerobic Gram-negative bacteria and spirochetes that adhere to Gram-positive bacteria were isolated from periodontitis pathologies (INSERM, 1999). *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* are considered the major pathogens of periodontitis and *Veillonella* species that are frequently associated with it, but no pathogenic activity has been attributed to this genus (AFSSAPS, 2001; INSERM, 1999). *Streptococcus* species are the commensal flora of the human oral cavity and may play a protective role in periodontal diseases (Hillman et al., 1985). Some strains, such as group D streptococci and

Enterococcus faecalis, are not commensal oral microflora (INSERM, 1999), and *Streptococcus pneumoniae* is not usually isolated from oral samples (Tanner et al., 1994). *Staphylococcus* species are associated with oral infections, such as gingivitis and local juvenile periodontitis (Rams et al., 1990). On the other hand, Tanner et al. (1994) showed that *Micrococcus* are not major pathogens, but they have occasionally been associated with infections in immunocompromised patients, and some *Bacillus* species are associated with human infections. Souto et al. (2014) showed that *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* are frequently detected in subgingival biofilms and the saliva of chronic periodontitis patients, whereas Enterobacteria and yeast are strains more isolated from the oral cavities of refractory periodontitis patients (AFSSAPS, 2001).

4.5. Antimicrobial activity results

The biological activities of *N. sativa* EO and ME were tested against four Gram-positive bacteria (*S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*), five Gram-negative bacteria (*Porphyromonas sp.*, *Veillonella sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, *Proteus sp.*) and two microscopic fungi strains (*Candida sp.* and *Saccharomyces sp.*).

4.5.1. Results of essential oil and methanol extract effects on microbial growth kinetics

We tested the bactericide, fungicide kinetic, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration

Table 3 Microbial strains isolated from the buccal cavity of periodontal patients.

| | Sexe | Age (yaers) | PI | GI | DI | CI | OHI | PII | Isolated microbial strains |
|-----------------|------|----------------|----|----|----|----|-----|-----|--|
| P ₁ | M | 56 | 8 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | <i>Streptococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , |
| P ₂ | W | 28 | 8 | 3 | 1 | 1 | 2 | 1 | <i>Streptococcus</i> sp., <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus D group</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> |
| P ₃ | M | 75 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Klebsiellapneumonia</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> sp., <i>Veillonella</i> sp. |
| P ₄ | W | 32 | 6 | 3 | 1 | 1 | 2 | 1 | <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. durans</i> <i>Streptococcus</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp., <i>Veillonella</i> sp., <i>Klebsiellapneumonia</i> , <i>Lactobacillus</i> sp |
| P ₅ | W | 50 | 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | <i>Streptococcus</i> sp., <i>Streptocoque D group</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>S. epidermidis</i> , <i>Proteussp</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Veillonella</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Candida</i> sp. |
| P ₆ | W | 48 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | <i>Escherichia</i> sp., <i>S. epidermidis</i> , <i>Streptococcus D group</i> , <i>Candida</i> sp. |
| P ₇ | M | 56 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | <i>S. epidermidis</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Streptococcus</i> sp., <i>Candida</i> sp. |
| P ₈ | W | 49 | 8 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | <i>S. aureus</i> , <i>Escherichia</i> sp., <i>Streptococcus D group</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Klebsiella pneumonia</i> |
| P ₉ | W | 41 | 9 | 3 | 2 | 2 | 4 | 3 | <i>Klebsiella pneumonia</i> ssp., <i>Pneumonia</i> , <i>Porphyromonas</i> sp., <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Acinetobacter baumannii/calcoacetecus</i> <i>Candida</i> sp. |
| P ₁₀ | W | 24 | 6 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3 | <i>Micrococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>S. epidermidis</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Saccharomyces</i> sp. |
| P ₁₁ | W | 16 | 6 | 2 | 3 | 2 | 5 | 2 | <i>Streptocoque D group</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Acinetobacter baumannii/calcoacetecus</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Candida</i> sp., |
| P ₁₂ | M | 60 | 8 | 3 | 2 | 2 | 4 | 3 | <i>Acinetobacter</i> , <i>baumannii/calcoacetecus</i> , <i>Pseudomonas maltophilia</i> , <i>Porphyromonas</i> sp., <i>Klebsiella pneumonia</i> ssp., <i>Pneumonia</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Streptococcus D group</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> |

P: Periodontal patients; M: Man; W: Woman; PI: Periodontal index; GI: gingivitis index; DI: Debris index; CI: Calculus index; OHI: Oral hygiene index; PII: plaque index.

(MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC) values of *N. sativa* EO and ME against the microbes tested. The EO (MBC: 16,500 µg/ml) has specific bactericidal activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Fig. 3a, b), but this efficiency did not reach statistical significance ($P \geq 0.05$) in some stains. On the other hand, the bactericidal activity decreased, and some strains resumed their growth after 18 h. The obtained results showed no activity at the lowest concentrations against all the micro-organisms tested, and *S. epidermis* was the most sensitive to EO (MBC: 8250 µg/ml for 18 h). EO has a specific effect on anaerobic strains, whereas *Saccharomyces* sp. was more sensitive (MFC: 8250 µg/ml) than *Candida* sp. (MCI: 16,500 µg/ml) to this extract in the first 18 h (Fig. 3c). The results of the ME antimicrobial activity showed a moderate antibacterial activity (MBC: 125,000 µg/ml) against all the microbes tested (Fig. 4a–c). *Staphylococcus aureus* was the most resistant, and *Porphyromonas* sp. (MBC: 31,250 µg/ml for 24 h) and *Proteus* sp. (MBC: 62,500 µg/ml for 24 h) were the most sensitive bacteria to ME during the incubation (* $P \leq 0.05$). Furthermore, the bactericidal activity of some strains decreased after 18 h of incubation, and growth resumed.

4.5.2. Results of the agar well diffusion method

The agar well diffusion method confirmed the antimicrobial activities of EO and ME against some microbes, but this efficiency was not clearly visible against other micro-organisms that have exhibited a high sensitivity to these extracts according to the microdilution method. EO was more active against *Proteus* sp. and *Saccharomyces* sp., while *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* were the most sensitive to ME (Fig. 5).

5. Discussion

These results showed the excellent antimicrobial activity of EO (MBC: 16,500 µg/ml) and moderate efficiency of ME (MBC:

125,000 µg/ml) against all the microbes tested. The results depended on the incubation time, the concentration of extract and the microbial strain tested. Our results confirmed that the efficiency of *N. sativa* EO against cariogenic bacteria and other Gram-positive bacterial strains (Jrah Harzallah et al., 2011; Ara et al., 2005). On the other hand, the bactericidal activity of some microbe strains tested was decreased, and the strains resumed their growth. This phenomenon could be the result of the reduced concentration of active substances in the culture medium or the altered physicochemical conditions that impair the efficiency of these active substances against micro-organisms; however, many studies have shown the resistance of Gram-negative bacteria to EO (Ali and Blunden, 2003; Toama et al., 1974). The current results confirmed the activity of the volatile Algerian *N. sativa* seed oil against numerous strains of this bacterial group (Ara et al., 2005). Biochemical and FT-IR results confirmed the richness of *N. sativa* extracts in polyphenols, flavonoids, ellagic acid, alcohols, phenols, and ketones. Generally, these molecules possess antimicrobial and therapeutic properties. Moreover, many active compounds (thymoquinone, thymohydroquinones, p-cymène, thymol, carvacrol, α and β pinene, alcohols, ketones, etc.) were characterized in the EO of *N. sativa* seeds collected from Adrar (Algeria) (Benkaci et al., 2007). They have bactericidal or bacteriostatic activity against different microbes (Salman et al., 2016; Halawani, 2009; Zhiri, 2006). Scandorieiro et al. (2016) suggested that hydrophobic bioactive compounds damage the cell membrane, increase cell permeability and affect biomolecule synthesis. According to Zhiri (2006), these activities depend on the chemical composition, functional groups (alcohols, phenols, ketones and terpene compounds) and synergistic effects of the major compounds. Methanol extract had a specific antimicrobial activity against all the microbes tested. This efficiency has been confirmed in many studies (Salman et al., 2016; Tanis et al., 2009; Aljabre et al., 2005; Kökdil et al., 2005), and Topozada et al. (1965) reported the antimicrobial

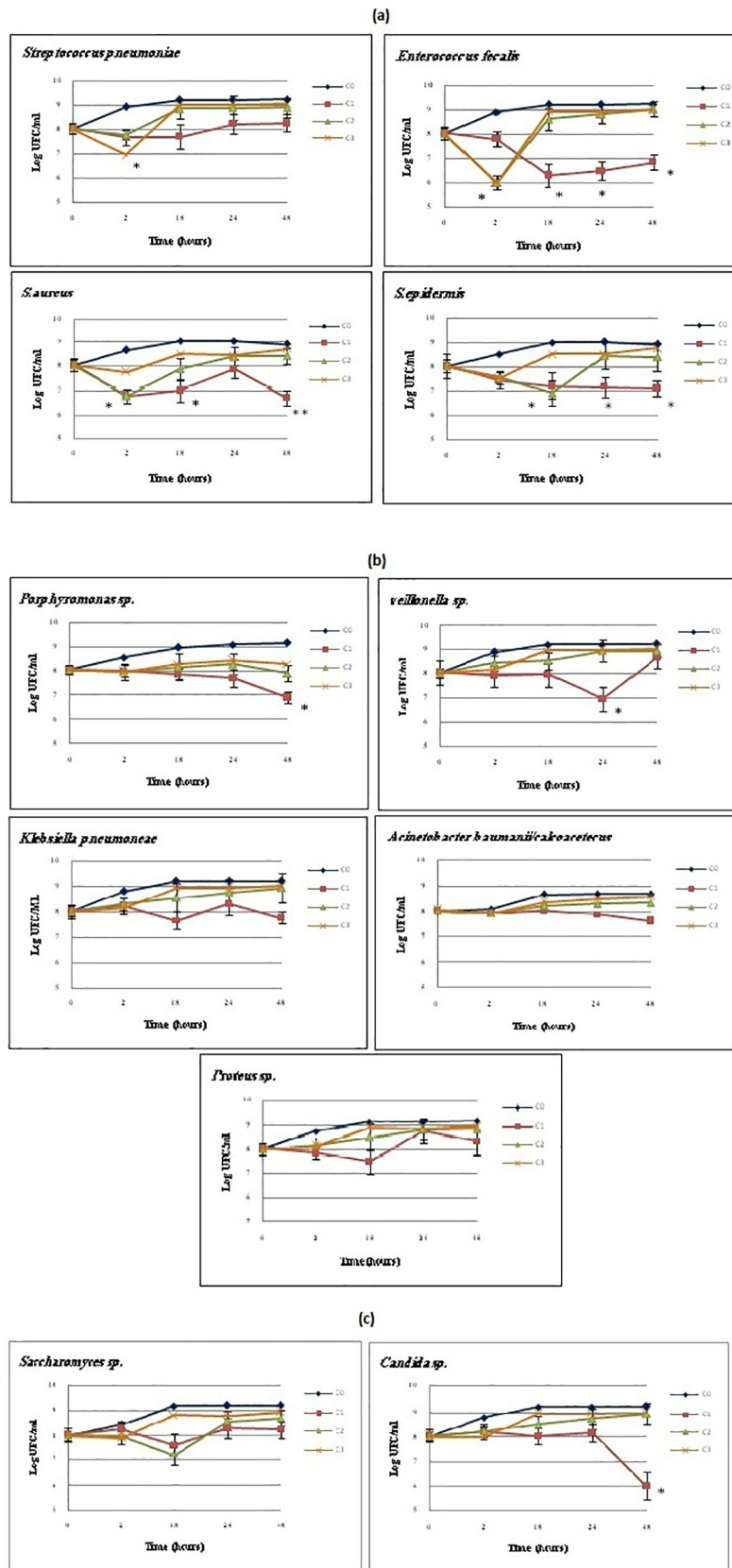


Fig. 3 Effect if *N. sativa* essential oil on growth of: (a) Gram positive bacteria; (b) Gram negative bacteria; (c) *Saccharomyces* sp and *Candida* sp. (*P = 0.05).

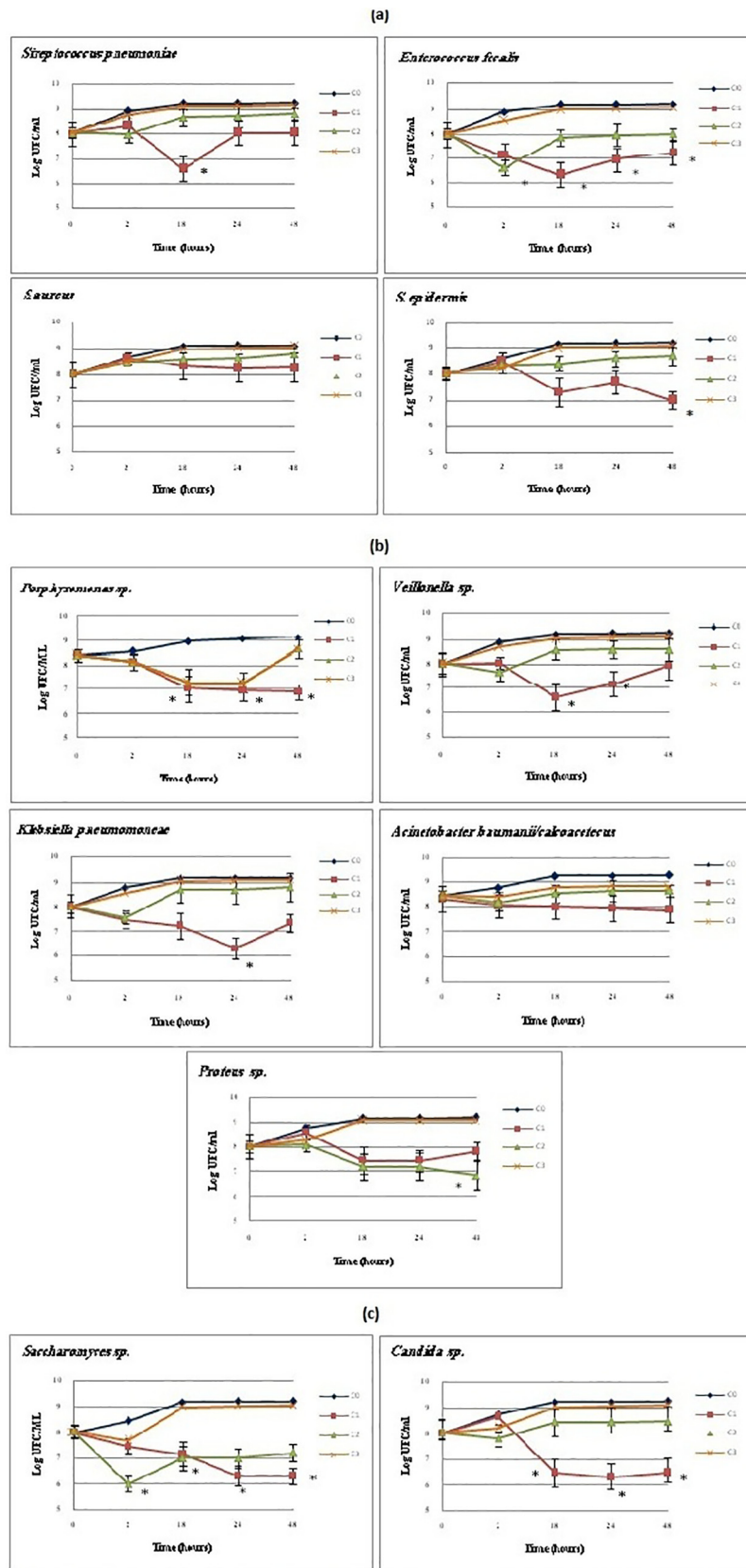


Fig. 4 Effect of *N. sativa* methanol extract on growth of: (a) Gram positive bacteria; (b) Gram negative bacteria; (c) *Saccharomyces sp* and *Candida sp*. (*P = 0.05).

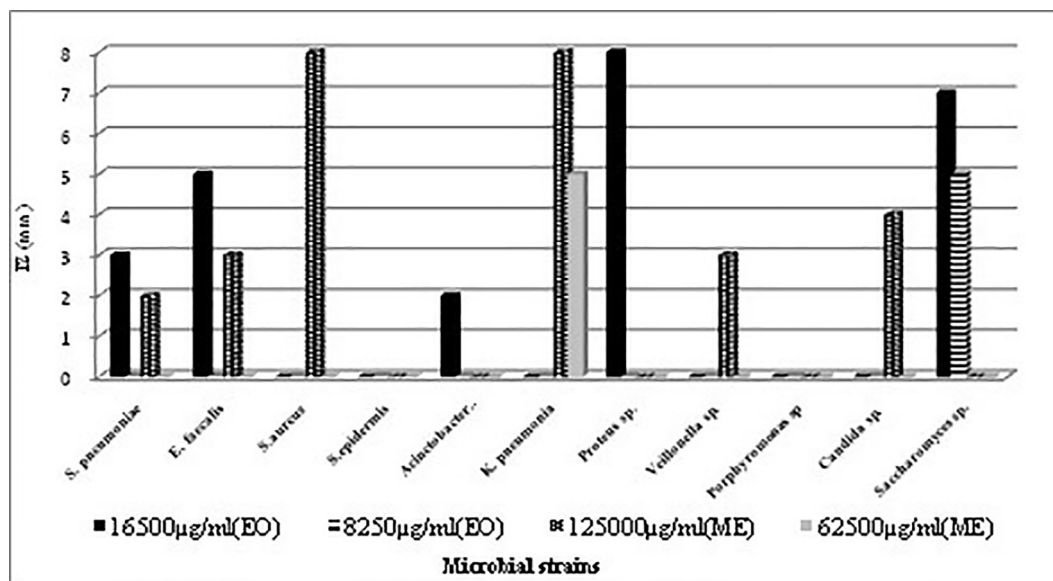


Fig. 5 Biological activity of essential oil (EO) and methanol extract (ME) of *N. sativa* seeds by agar well diffusion method.

activity of *N. sativa* seed phenolic compounds by inhibiting bacterial proteins synthesis (Mason and Wasserman, 1987), whereas thymoquinone and tannins can be extracted from ME (Salman et al., 2016; Eloff, 1998) and also have antimicrobial activity (Hashem and El-Kiey, 1982). Our study showed that the polyphenol and flavonoid contents in ME were higher than those in EO, but the latter had a stronger antimicrobial effect (MBC of 16,000 µg/ml), which could be explained by the difference in the EO and ME compounds and confirm the antimicrobial activity of the non-polar fraction of *N. sativa* extracts. Moreover, among all the microbial growth kinetic results indicated the bactericidal actions of EO and ME. On the other hand, the results of the agar well diffusion method did not reflect the effectiveness of the *N. sativa* extracts against the microbes tested. According to Mahmoudi et al. (2016) and Salem et al. (2013b), the inhibition zone (IZ) values are potentially affected by the solubility of the oil, the diffusion range in the agar, and the evaporation. Additionally, the strains that were the most sensitive (lower MIC values) did not always have the biggest inhibition zones (diffusion method) because the diameter of the inhibition zones does not reflect the antibacterial activity of a compound.

6. Conclusion

Remarkable efficiencies of the essential oil and methanol extract of *N. sativa* seeds collected from South Algeria against the growth of microbes isolated from the oral cavity of periodontitis patients were elucidated by the microdilution method, while the agar well diffusion method did not reflect these results. This proves that several factors can influence the antimicrobial activity of these extracts, and these results must be reproduced by other studies (*in vitro* and *in vivo*) to support the hypothesis regarding the efficacy of *N. sativa* against oral pathologies.

Conflicts of interest statement

We have no conflicts of interest to declare.

References

- Aas, J.A., Paster, B.J., Stoke, L.N., Olsen, I., Dewhirst, F.E., 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 11, 5721–5732. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>.
- Abu-Al-Basal, M.A., 2009. *In vitro* and *In vivo* anti-microbial effects of *Nigella sativa* Linn. seed extracts against clinical isolates from skin wound infections. *Am. J. Appl. Sci.* 6, 1440–1447.
- AFSSAPS, 2001. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, Prescription des antibiotiques en odontologie et stomatologie-Argumentaire.
- Al-Gaby, A.M.A., 1998. Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* (black cumin) cake protein. *Nahrung* 42, 290–294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(199810\)42:05<290::AID-FOOD290>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(199810)42:05<290::AID-FOOD290>3.0.CO;2-Y).
- Ali, B.H., Blunden, G., 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother. Res.* 17, 299–305. <https://doi.org/10.1002/ptr.1309>.
- Aljabre, S.H.M., Randhawa, M.A., Akhtar, N., Alakloby, O.M., Alqurashi, A.M., Aldossary, A., 2005. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *J. Ethnopharmacol.* 101, 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.002>.
- Ara, N., Choudhury, S.A.R., Ruhul, A., 2005. *In vitro* antimicrobial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* Linn Seeds. *TAJ* 18, 109–112.
- Benkaci, A.F., Baaliouamer, A., Meklati, B.Y., Chemat, F., 2007. Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour Fragr. J.* 22, 148–153. <https://doi.org/10.1002/ffj.1773>.
- Bertrand, D., Dufour, E., 1987. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. Lavoisier Tec et doc, Paris.

- Bidault, P., Chandad, F., Grenier, D., 2007. Risques de résistance bactérienne liée à l'antibiothérapie systémique en parodontie-Pratique clinique. *J. Can. Dent. Assoc.* 73, 721–725.
- Blanchaud-desce, M., Fosset, B., Guyot, F., Jullien, L., Palacin, S., 1987. *Chimie organique expérimentale*. Ed Hermann, 1987, pp. 27–37.
- Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B., 2008. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. *C. R. Biol.* 331, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2007.11.001>.
- Brossard, H., Leyral, G., Terry, O., 2006. Activités technologiques en microbiologie, Tome 2 Bactériologie systématique, ed. CRDP Aquitaine, France.
- 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 Chem.* 101, 673–681. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.022>.
- Colombier, M.L., Leroy, P., Yasukawa, K., 2006. Bacterial tests on periodontitis. *Bull. Acad. Natle Chir. Dent.* 49, 97–102.
- Denis, F., Ploy, M.C., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R., 2007. *Bactériologie médicale, techniques usuelles*. Elsevier Masson.
- Djelouat, S., 1990. Le diagnostic biochimique bacterien. *Collection guides pratiques, microbiologie medicale. sciences et techniques, Constantine, Algerie*, p. 118.
- El-Agbar, Z.A., Shakya, A.K., Khalaf, N.A., AL-Haroon, M., 2008. Comparative antioxidant activity of some edible plants. *Turk. J. Biol.* 32, 193–196.
- Eloff, J.N., 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *J. Ethnopharmacol.* 60, 1–8.
- Gendron, R., Grenier, D., Maheu-Robert, L.F., 2000. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. *Microbes Infect.* 2, 897–906. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\), 00391-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00), 00391-9).
- Halawani, E., 2009. Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Advan. Biol. Res.* 3, 148–152.
- Hashem, F.M., El-Kiey, M.A., 1982. *Nigella sativa* seeds of Egypt. *J. Pharm. sci.* 3, 121–133.
- Hillman, J.D., Socransky, S.S., Shivers, M., 1985. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. *Arch Oral Biol* 30, 791–795. In: Tanner, A., Maiden, M.F.J., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., 1994. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Periodontol.* 2000 5, 26–51.
- Holt, S.C., Bramanti, T.E., 1991. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2, 177–281.
- Houcher, Z., Boudiaf, K., benboubetra, M., Houcher, B., 2007. Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa* L. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats. *Pteridines* 18, 8–18.
- INSERM, Institut national de la santé et de la recherche médicale, 1999. Maladies parodontales «Thérapeutiques et prévention» Expertise Collective. Rapport établi à la demande de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale-ed. INSERM, Paris.
- Jrah Harzallah, H., Kouidhi, B., Flamini, G., Bakhrouf, A., Mahjoub, T., 2011. Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. *Food Chem.* 129, 1469–1474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.117>.
- Kinane, D.F., 2001. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology* 25, 8–20.
- Kökçü, G., Delialioğlu, N., Özbilgin, B., Emekdaş, G., 2005. Antilisterial activity of *ballotaspecies* growing in turkey- antibacterial activity screening of *Nigella* L. species growing in Turkey. *J. Fac. Pharm* 34, 183–190.
- Leyral, G., 1973. *Bactériologie-BA73, sequences let 2*, ed CNED-Toulouse.
- Leyral, G., Joffin, J.N., 1998. *Microbiologie technique: tome 2, Documentation technique (Biologie technique)*. CRDP d'Aquitaine, Bordeaux.
- Mahmoudi, H., Aouadhi, C., Kaddour, R., Gruber, M., Zargouni, H., Zaouali, W., Ben Hamida, N., Ben Nasri, M., Ouerghi, Z., Hosni, K., 2016. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of two cultivated *Cistus* species from Tunisia. *Biosci. J.* 32, 226–237.
- Mariotti, A., Hefiti, A.F., 2015. Defining periodontal health. *BMC Oral Health* 15 (Suppl 1), S6. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-15-S1-S6>.
- Mason, T.L., Wasserman, B.P., 1987. Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry* 26, 2197–2202.
- Mayrand, D., Grenier, D., 1998. Bacterial interactions in periodontal diseases. *Bull. Inst. Pasteur* 96, 125–133.
- Molly, K., Vande Woestyne, M., Verstaete, W., 1993. Development of a 5 step multi-camber reactor as a simulation of human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 254–258. In: Chelli-Chentouf, N., TirTouilMeddah, A., Mullie, C., Aoues, A., Meddah, B., 2012. In vitro and in vivo antimicrobial activity of Algerian Hoggar *Salvadora persica* L. extracts against microbial strains from children' soral cavity. *J. Ethnopharmacol.* 144, 57–66.
- Orsi Llinares, F., 2005. La nigelle, une épice d'intérêt médicinal, thèse doctorat en pharmacie, faculté de pharmacie de Grenoble, Université Joseph Fourier.
- Padhye, S., Banerjee, S., Ahmad, A., Mohammad, R., Sarkar, F.H., 2008. From here to eternity, the secret of Pharaohs: therapeutic potential of black cumin seeds and beyond. *Cancer Ther.* 6, 495–510.
- Phillips, J.D., 1992. Medicinal plants. *Biologist* 39, 187–191.
- Rams, T.E., Feik, D., Slots, J., 1990. Staphylococci in human periodontal diseases. *Oral Microbiol. Immunol.* 5, 29–32. In: Tanner, A., Maiden, M.F.J., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., 1994. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Periodontol.* 2000 5, 26–51.
- Salem, M.Z.M., Ali, H.M., El-Shanhorey, N.A., Abdel-Megeed, A., 2013a. Evaluation of extracts and essential oil from *Callistemon viminalis* leaves: Antibacterial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 785–791
- Salem, M.Z.M., Aly, H., Gohar, Y., El-Sayed, A.W., 2013b. Biological activity of extracts from *Morus alba* L., *Albizia lebeck* (L.) Benth. and *Casuarina glauca* Sieber against the growth of some pathogenic bacteria. *IJAFR* 2, 9–22.
- Salman, M.T., Khan, R.A., Shukla, I., 2016. Antibacterial activity of *Nigella Sativa* Linn. seeds against multiple antibiotics resistant clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Int. Arch. BioMed Clin. Res.* 2, 96–99. <https://doi.org/10.21276/iabcr.2016.2.3.24>.
- Scandorieiro, S., Camargo, L.C., Lancheros, C.A.C., Yamada-Ogatta, S.F., Nakamura, C.V., Oliveira, A.G., Andrade, C.G.T.J., Duran, N., Nakazato, G., Kobayashi, R.K.T., 2016. Synergistic and additive effect of Oregano essential oil and biological Silver nanoparticles against Multidrug-Resistant bacterial strains. *Front. Microbiol.* 7, 760. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00760>.
- Silva, N., Abusleme, L., bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., Hernández, M., Gamonal, J., 2015. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J. Appl. Oral Sci.* 23, 329–355. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140259>.
- Souto, R., Silva-Boghossian, C.M., Colombo, A.P., 2014. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp.* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Braz. J. Microbiol.* 45, 495–501.
- Tanis, H., Aygan, A., Digrak, M., 2009. Antimicrobial activity of four *Nigella* species Grown in Southern Turkey. *Int. J. Agric. Biol.* 11, 771–774.

- Tanner, A., Maiden, M.F.J., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., 1994. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Periodontology* 2000 (5), 26–51.
- Toama, M.A., EL-Alfy, T.S., EL-Fataty, H.M., 1974. Antimicrobial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* Linneaus Seeds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 6, 225–226.
- Toparslan, C., 2012. À propos de *Nigella sativa* L., These de doctorat en pharmacie, faculte de pharmacie, universite de Lorraine.
- Topozada, H.H., Masloum, H., El-Dakhakhany, M., 1965. The antibacterial properties of *Nigella sativa* seeds: active principle with some clinical application. *J. Egypt. Med. Asso.*, 48(suppl): 187-202.
- In: Shohayeb, M., Halawani, E., 2012. Comparative antimicrobial activity of some active constituents of *N. sativa* L. *World Appl. Sci. J.* 20, 182–189. <http://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.20.02.7156>.
- Touchstone, J., Dobbins, M.F., 1983. *Practice of thin layer chromatography*, wiley Interscience. Berlin, 1–13.
- Wei, S.H.Y., Lang, N.P., 1982. Periodontal epidemiological indices for children and adolescents: II. Evaluation of oral hygiene; III. Clinical applications. *Pediatr. Dent.* 4, 64–73.
- Yacoubi, A., Djamil, B., Makhrelouf, L., Bensoltane, A., 2010. Microbiological Study of Periodontitis in the West of Algeria. *World J. Med. Sci* 5, 7–12.
- Zawadzki, J., 1989. Infrared spectroscopy in surface chemistry of ethylene. In: Yakout, S.M., Sharaf El-Deen, G., 2016. Characterization of activated carbon prepared by phosphoric acid activation of olive stones. *Arab. J. Chem.* 9, 1155–1162. <http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.12.002>.
- Zhiri, A., 2006. Aromathérapie. *Nutra news, science, nutrition, prévention et santé*, ed Fondation pour le libre choix, pp. 2–16.