

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun–Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Masteracadémique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Infectiologie

Présenté par :

DAHOU Senia

ZERROUKI Imane

ZITOUNI Maroua

Thème

**Effet de *Nigella sativa* sur *Clostridium perfringens*
detype A**

Soutenu publiquement le 29 septembre 2020

Jury:

Président: HAMDI Mohamed

Encadreur: MERATI Rachid

Co-encadreur: /

Examineur : TABAK Souhila

Grade

M.A.A

M.C.B

M.C.A

Année universitaire 2019/2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَمَا تَوْفِيقِي إِلَّا بِاللَّهِ عَلَيْهِ تَوَكَّلْتُ وَإِلَيْهِ أُنِيبُ.

قال رسول الله صلى الله عليه وسلم: "الحبة السوداء شفاء لكل داء ما عدا السام قيل وما السام قال الموت" متفق عليه.



En premier lieu, nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

*En second lieu, nous voudrions bien remercier **Dr Merati Rachid**, notre encadreur, pour ses précieux conseils et son aide durant toute la période du travail. Vous nous avez fait confiance en acceptant de nous guider dans la réalisation de ce travail qui est d'ailleurs le votre. Nous avons bénéficié de vos qualités pédagogiques et humaines malgré les conditions difficiles du Corona-virus dans lesquelles nous vivons.*

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

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

Merci... 



Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance...Aussi, c'est tout simplement que je dédie ce mémoire à ... ?

A ALLAH

Le tout miséricordieux, le très miséricordieux, le tout puissant, qui m'a inspiré, qui ma guidé sur le droit chemin, je vous dois ce que je suis devenue, soumission, louanges et remerciements, pour votre clémence et miséricorde.

Ames chers parents

J'ai vécu en admirant votre grande personnalité et votre gentillesse. Vous êtes pour moi l'exemple de la réussite et un grand cœur. J'espère que cette thèse symbolise les fruits de vos longues années de sacrifices que vous avez consentis pour mes études et mon éducation.

A mes très chers Frères

Aziz, Khaled, Rabeh, Aymen, Malika, Dhaoia, Nabia

A mes très chers amis (es)

Hanane, Rawnek, Mebaraka, Sabrina, Kadidja, Imaneet Maroua vous êtes pour moi plus que des amis! Je ne saurais trouver une expression témoignant de ma reconnaissance et des sentiments de fraternité que je vous porte. Je vous

dédie ce travail en témoignage de notre amitié que j'espère durera

toute la vie. A tous ceux qui me sont chers et que

j'ai omis de citer..Senia...



*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mes chers parents **Mehamedet***

***Bakhta** qui m'ont dirigé et suivi pendant toutes mes années d'étude*

et surtout ma mère pour ses sacrifices, sapatience sans limite et

l'éducation qu'elle m'a donnée, je lui

dit merci mille fois

Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à :

*Mon cher frère : **Ahmed.***

*Ma sœur : **Mimouna** et ses enfants : **Senae, Abobakar,***

Ahmed, Mehamed.

*Ma sœur: **Fatima, Souhila.***

*Egalement je dédie ce travail à mes amies : **Senia, Maroua.***

Imane



Je dédie ce modeste travail aux êtres qui me sont plus chers, je cite

*Mes chers parents **Fahia** et **Aicha** pour leur amour, leur tendresse,
leur soutien et leur prières tout au long de mes études*

*Mon cher frère **Abd El Wahid** pour son appui et son encouragement*

*A mes chers sœurs **Noura**, **Sommaïet** **Nawal** pour leurs
encouragements permanents,
et leur soutien moral.*

*Et tous mes amis **Senia**, **Imane**, **Ghania**, **Sommaïet** **Zohra**.*

Maroua...

Résumé

Notre étude avait pour objectif d'évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Nigella sativa* vis-à-vis du *Clostridium perfringens* de type A responsable d'entérite nécrotique chez le poulet de chair. La première partie de notre étude visait l'extraction de l'huile essentielle de *Nigella sativa*, et la deuxième partie portait sur l'évaluation, *in vitro*, de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle sur le *Clostridium perfringens* de type A isolé à partir de cas d'entérite nécrotique chez le poulet de chair. Suite aux difficultés rencontrées durant la réalisation de la partie expérimentale, nous avons discuté les différentes recherches réalisées sur l'effet antibactérien de *Nigella sativa*. Les résultats indiquent que cette plante possède plusieurs constituants actifs qui peuvent jouer un rôle important dans la lutte contre un nombre considérable de bactéries Gram (+) et (-), nous suggérons ainsi que *Nigella sativa* pourrait peut-être avoir un effet antibactérien contre le *Clostridium perfringens* de type A isolé à partir de cas d'entérite nécrotique chez le poulet de chair.

Mots clés : *Clostridium perfringens*, Entérite nécrotique, *Nigella sativa*, poulet de chair, Tiaret.

Abstract

Our study aimed to evaluate the antibacterial activity of the essential oil of *Nigella sativa* against *Clostridium perfringens* type A responsible for necrotic enteritis in broiler chickens. The first part of our study aimed at extracting the essential oil of *Nigella sativa*, and the second part concerned the evaluation, *in vitro*, of the antibacterial activity of the essential oil against *Clostridium perfringens* type A isolated from cases of necrotic enteritis in broiler chickens. Following the difficulties encountered during the realization of the experimental part, we discussed the different researches carried out on the antibacterial effect of *Nigella sativa*. The results indicate that this plant has several active constituents which can play an important role in fighting a considerable number of Gram (+) and (-) bacteria, thus we suggest that *Nigella sativa* could possibly have an antibacterial effect against the *Clostridium perfringens* type A isolated from cases of necrotic enteritis in broiler chickens.

Key words: *Clostridium perfringens*, Necrotic enteritis, *Nigella sativa*, Broiler chickens, Tiaret.

الملخص

هدفت دراستنا إلى تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيت العطري من حبة البركة ضد كلوستريديوم برفرنجنس من النوع A المسؤول عن التهاب الأمعاء التكرزي في الدجاج. استهدف الجزء الأول من دراسة استخراج الزيت العطري من حبة البركة، فيما يتعلق الجزء الثاني تم بالتقييم، في المختبر، للنشاط المضاد للبكتيريا للزيت العطري على كلوستريديوم برفرنجنس من النوع A. معزولة عن حالات التهاب الأمعاء التكرزي في دجاج التسمين. بعد الصعوبات التي واجهناها أثناء تحقيق الجزء التجريبي، ناقشنا الأبحاث المختلفة التي أجريت على التأثير المضاد للبكتيريا لحبة البركة. تشير النتائج إلى أن هذا النبات يحتوي على العديد من المكونات النشطة التي يمكن أن تلعب دوراً مهماً في محاربة عدد كبير من البكتيريا الجرام (+) و(-)، لذلك نقترح أن الحبة السوداء قد يكون لها تأثير مضاد للجراثيم ضد البكتيريا كلوستريديوم برفرنجنس من النوع A المسؤول عن التهاب الأمعاء التكرزي في دجاج التسمين.

الكلمات المفتاحية : كلوستريديوم برفرنجنس، التهاب الأمعاء التكرزي، دجاج التسمين، تيارت.

Liste des abréviations

- ARNm:** Acide ribonucléique messenger.
- CD4:** Cluster de différenciation 4.
- CD8:** Cluster de différenciation 8.
- C. difficile*** : *Clostridium difficile*.
- C. perfringens***: *Clostridium perfringens*.
- C. welchii***: *Clostridium welchii*.
- DMSO:** Diméthyl sulfoxyde.
- E. coli***: *Escherichia coli*.
- EN:** Entérite nécrotique.
- IL-1 β** : Interleukine –1 β .
- IL-3:** Interleukine –3.
- IL-5:** Interleukine –5.
- IL-13:** Interleukine-13.
- LPS:** Lipopolysaccharide.
- LT4:** Lymphocyte T4.
- LTh:** Lymphocytaire T helper.
- MLST:** Multilocus séquence typing (Typage génomique multilocus).
- NaCl:** Chloride de sodium.
- NK:** Natural Killer (cellules tueuses naturelles).
- NO:** Nitric toxide.
- NOS:** Nitrique oxyde synthase.
- PFGE:** Pulsed Field Gel Electrophoresis (électrophorèse à champs pulsés).
- TQ:** Thymoquinone.
- TSC:** Tryptone sulfite cyclosérine.
- TSN:** Tryptone sulfite néomycine.
- UFC:** Unité formant colonie.
- US:** United states (états unis).

Liste des tableaux.

Tableau 1	: Classification des toxinotypes de <i>C. Perfringens</i> selon les toxines majeures Produites.....	14
Tableau 2	: Matériel de laboratoire.....	24

Liste des figures

Figure1: Photos présentant la fleur et les graines de <i>Nigella sativa</i>05
Figure 2 : Photo des graines de <i>Nigella sativa</i>	24
Figure 3 : La souche toxigène de <i>C. perfringens</i> type A sous forme lyophilisée.....	25
Figure 4 : Protocole expérimentale d'extraction des huiles essentielles.....	25
Figure 5 : L'appareil utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation...	27

Table des matières

Introduction.....	02
-------------------	----

Revue bibliographique

Chapitre I : *Nigellasativa*Linn

1 Morphologie de la plante	05
2 Caractéristique des graines et de la poudre	05
3 Composition chimique des graines	06
4 Utilisation traditionnelle des graines	07
5 Activités pharmacologique de <i>Nigellasativa</i>	08
5.1 Activité antibactérienne	08
5.2 Activité antifongique	08
5.3 Activité antioxydant	09
5.4 Activité anti-inflammatoire	09
5.5 Activité anticancéreuse	10
5.6 Activité sur le système immunitaire	11
5.7 Activité sur le système gastro-intestinal	11

Chapitre II : *Clostridiumperfringens*

1 Caractéristiques générales de la bactérie	12
2 Identification et classification	13

ChapitreIII: L'entérite nécrotique chez le poulet

1 Etiologie	15
2 Epidémiologie	15
3 Source de contamination	16
4 Pathogénie	17

5	Signe clinique	19
6	Lésions macroscopique	19
7	Diagnostique	20
8	Traitement	21

Matériel et méthodes

1	Objectif.	23
2	Lieu et période de travail	23
3	Matériel	23
3.1	Matériel végétal	23
3.2	Matériel de laboratoire	24
3.3	Souche bactérienne testée	24
4	Méthodes	25
4.1	Protocole expérimental	25
4.2	Extraction de l'huile essentielle.....	26
4.2.1	Hydrodistillation	26
4.2.2	Description de l'extraction de l'huile essentielle	26
4.2.3	Détermination du rendement d'extraction	27
4.3	Préparation des dilutions à tester de l'huile essentielle	27
4.4	Préparation de la souche bactérien.....	28
4.5	Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu Gélosé.....	28
	Résultats et discussions	30
	Conclusion et perspectives	35
	Références	37
	Annexe	52

Introduction

Introduction

L'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance est apparue à l'ère de l'industrialisation après la Seconde Guerre mondiale (**Juke *etal.*, 1956**). Pendant de nombreuses années, ces promoteurs de croissance antimicrobiens ont été largement utilisés dans les aliments destinés aux volailles pour prévenir et contrôler les agents pathogènes intestinaux, mais aussi à des fins économiques pour favoriser la croissance et améliorer l'efficacité alimentaire(**Van Immersee*letal.*, 2009**).

Cependant, l'utilisation à grande échelle et en continu d'antibiotiques chez les animaux de consommation n'est pas sans conséquence, cette pratique a suscité des inquiétudes face aux risques d'émergence de résistance bactériennes (**O'Brien, 2002**). En janvier 2006, la commission européenne a interdit l'usage des antibiotiques comme promoteurs de croissance, cette loi a été appliquée par la suite en Algérie en décembre 2006 (Décision ministérielle n° 472 du 24 Décembre 2006, portant sur l'utilisation des additifs dans l'alimentation animales).

Suite au retrait des antibiotiques dans les aliments pour volailles, les producteurs ont observé une recrudescence de l'EN dans les élevages avicoles, une maladie intestinale causée par la bactérie *C. perfringens* qui est responsable de grandes pertes économiques pour l'industrie de la production avicole (**Wade et Keyburn, 2015**),et l'un des plus importants agents causals de toxi-infections alimentaires collectives chez l'homme (**Fisher *etal.*, 2005**).

En raison des pertes économiques importantes pour la production de volailles causées par l'EN(**Wade et Keyburn, 2015**),l'utilisation des antibiotiques à visée curative pour prévenir les coûts élevés s'est généralisée, conduisant à l'émergence de souches de *C. perfringens* dotées de mécanismes de résistance contre ces antibiotiques (**Adam *etal.*, 2018**). De plus, des études antérieures, effectuées dans différentes régions du monde, ont rapporté

que les souches de *C. perfringens* isolées de volailles ont montré des résistances contre plusieurs antibiotiques (**Mwangi *et al.*, 2019 ; Eid *et al.*, 2020**).

La communauté scientifique a déployé beaucoup d'efforts au cours des dernières années afin d'identifier des stratégies alternatives pouvant être utilisées en remplacement à ces antibiotiques afin d'assurer le contrôle de l'EN dans les élevages avicoles (**Hume, 2011**), et ainsi prévenir l'apparition des souches de *C. perfringens*, responsables de toxi-infections alimentaires collectives, résistantes aux antibiotiques.

Les plantes utilisées en médecine traditionnelle contiennent une large gamme d'ingrédients qui peuvent être utilisés comme alternatives aux antibiotiques pour traiter les maladies infectieuses (**Ali Benhaddou, 2009**). Parmi ces plantes les plus utilisées et qui ont suscité un grand intérêt pour les pays méditerranéens et asiatiques, on trouve *Nigella sativa* Linn. Cette plante appartenant à la famille des Ranunculaceae, communément connue sous le nom de cumin noir ou nigelle, possède différents effets pharmacologiques : antimicrobien, antioxydant, anti-inflammatoire, immuno-modulateur, anti-tumoral, anti-diabétique et elle joue un rôle non négligeable dans les systèmes cardio-vasculaire et gastro-intestinal (**Toparlan, 2012**).

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'effet antimicrobien de *Nigella sativa* sur le *C. perfringens* de type A provenant de troupeaux affectés par l'EN au niveau de la région de Tiaret. De ce fait, notre étude a pour objectif d'évaluer, *in vitro*, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Nigella sativa* vis-à-vis du *C. perfringens* de type A responsable d'EN chez le poulet de chair.

Revue bibliographique

Chapitre I : *Nigella sativa* Linn

1. Morphologie de la plante

Nigella sativa est une plante à fleurs annuelle qui peut atteindre 20-90 cm de hauteur, avec des feuilles finement divisées et des segments foliaires étroitement linéaires à filiformes. Les fleurs sont délicates et généralement colorées en blanc, jaune, rose, bleu pâle ou violet pâle, avec 5-10 pétales. Le fruit est une grande capsule gonflée composée de 3-7 follicules unis, contenant chacun de nombreuses graines (Goreja, 2003 ; Warriar *et al.*, 2004).



Figure 1.Photos présentant la fleur et les graines de *Nigella sativa*.

2. Caractéristiques des graines et de la poudre

Macroscopiquement, les graines sont petites, triangulaires, anguleuses, d'une taille de 2-3,5 mm sur 1-2 mm, noires à l'extérieur et blanches à l'intérieur, odeur légèrement aromatique et goût amer. Au microscope, la coupe transversale de la graine montre un épiderme à une seule couche composé de cellules elliptiques à parois épaisses, recouvertes à l'extérieur par une cuticule papilleuse et remplies de contenu brun foncé. L'endosperme est constitué de cellules à parois minces, rectangulaires ou polygonales, principalement remplies

de globules d'huile. La poudre des graines montre, au microscope, des cellules parenchymateuses et des globules d'huile noir brunâtre (Khare, 2004 ; Warriretal., 2004).

3. Composition chimique des graines

De nombreux composés actifs ont été isolés, identifiés et signalés jusqu'à présent dans différentes variétés de graines noires. Les composés actifs les plus importants sont la thymoquinone (30% - 48%), la thymohydroquinone, la dithymoquinone, le p-cymène (7% - 15%), le carvacrol (6% -12%), le 4-terpinéol (2% -7%), t-anéthol (1% -4%), sesquiterpène longifolène (1% -8%) α -pinène et thymol etc. Les graines noires contiennent également d'autres composés en quantités infimes. Les graines contiennent deux types différents d'alcaloïdes; c'est-à-dire les alcaloïdes d'isoquinoléine, par exemple : la nigellicimine et la nigellicimine N-oxyde, et les alcaloïdes pyrazoliques ou les alcaloïdes portant un cycle indazole qui comprennent la nigellidine et la nigellicine. De plus, les graines de *Nigella sativa* contiennent également de l'alpha-hédérine, un triterpène pentacycliques soluble dans l'eau et de la saponine, un agent anticancéreux potentiel(Ahmadetal., 2013).

Certains autres composés, par exemple carvone, limonène, citronellol ont également été trouvés en quantités infimes. La plupart des propriétés pharmacologiques de *Nigella sativa* sont principalement attribuées aux constituants de la quinone, dont la TQ est la plus abondante. Au stockage, la TQ produit de la dithymoquinone et des produits d'oligocondensation supérieurs. Les graines de *Nigella sativa* contiennent des protéines (26,7%), des graisses (28,5%), des glucides (24,9%), des fibres brutes (8,4%) et des cendres totales (4,8%). Les graines contiennent également une bonne quantité de diverses vitamines et minéraux comme Cu, P, Zn et Fe etc. Les graines contiennent du carotène qui est converti par le foie en vitamine A. Les racines et les pousses contiennent de l'acide vanillique (Ahmad etal., 2013).

Les graines peuvent contenir de l'huile grasse riche en acides gras insaturés, principalement l'acide linoléique (50-60%), l'acide oléique (20%), l'acide eicodadiénoïque (3%) et l'acide dihomolinoléique (10%). Les acides gras saturés (palmitique, acide stéarique) représentent environ 30% ou moins. L' α -sitostérol est un stérol majeur, qui représente respectivement 44% et 54% du total des stérols dans les variétés tunisiennes et iraniennes d'huiles de graines noires, suivi du stigmastérol (6,57-20,92% du total des stérols)(**Cheikh-Rouhouetal., 2008**).

4. Utilisations traditionnelles des graines

Nigella sativa est traditionnellement utilisée pour le traitement de divers troubles, maladies et affections du système respiratoire, du tube digestif, de la fonction rénale et hépatique, du système cardio-vasculaire et du système immunitaire. Elle est aussi utilisée pour le bien-être général (**Goreja, 2003 ; Sharmaetal., 2005**).

Avicenne a fait référence aux graines noires dans le «Canon de la médecine», car les graines stimulent l'énergie du corps et aident à se remettre de la fatigue et du découragement. Les graines noires et leur huile ont une longue histoire dans la civilisation indienne et arabe comme nourriture et médecine (**Warriieretal., 2004 ; Yarnell et Abascal, 2011**). Les graines ont été traditionnellement utilisées dans les pays d'Asie du Sud-Est et du Moyen-Orient pour le traitement de plusieurs maladies et affections, notamment l'asthme, la bronchite, les rhumatismes et les maladies inflammatoires. Ses nombreuses utilisations ont valu à *Nigella sativa* l'approbation arabe «Habbatul barakas», ce qui signifie la graine de la bénédiction. Une teinture préparée à partir des graines est utile dans l'indigestion, la perte d'appétit, la diarrhée, l'hydropisie, l'aménorrhée et la dysménorrhée et dans le traitement des vers et des éruptions cutanées. Extérieurement, l'huile est utilisée comme antiseptique et anesthésique local. Des

graines noires grillées sont données par voie orale pour arrêter les vomissements (Warrieretal., 2004 ; Sharma et al., 2005 ; Yarnell et Abascal, 2011 ; Padhyeetal., 2008).

5. Activités pharmacologiques de *Nigella sativa*

5.1 Activité antibactérienne

Les différents extraits des graines de *Nigella sativa* présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes. L'activité antimicrobienne de différents extraits bruts de *Nigella sativa* a été testée sur différents isolats bactériens dont 16 isolats à Gram négatif et 6 isolats à Gram positif. Ces derniers ont montré de multiples résistances contre les antibiotiques, spécialement les Gram négatifs. Les extraits bruts de *Nigella sativa* ont montré un effet prometteur contre certains organismes. Les extraits les plus efficaces étaient les alcaloïdes bruts et les extraits aqueux. Les isolats à Gram négatif ont présenté plus de sensibilité par rapport à ceux à Gram positif (Morsi, 2000). Hannan et al. (2008) ont étudié l'activité antibactérienne de *Nigella sativa* sur des isolats cliniques de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline, et ont constaté que toutes les souches testées étaient sensibles à l'extrait éthanolique de *Nigella sativa* à une concentration de 4 mg/disque avec une concentration minimale inhibitrice de 0,2 à 0,5 mg/ml.

5.2. Activité antifongique

Plusieurs recherches ont rapporté que les extraits méthanoliques de *Nigella sativa* possèdent un effet antifongique supérieur à celui des extraits chloroformiques contre différentes souches de *Candida albicans*, alors que les extraits aqueux ne possèdent aucune activité antifongique (Ahmad et al., 2013). De plus, dans une étude effectuée par Khan et al. (2003), un inoculum intraveineux de *Candida albicans* a produit des colonies au niveau du foie, la rate et les reins. Le traitement des souris avec l'extrait de plante de *Nigella sativa* 24 h après l'inoculation a provoqué un effet inhibiteur considérable sur la croissance de ce

champignon dans tous les organes étudiés. L'huile fixe de cette graine présente aussi une excellente activité antifongique sur *Aspergillus Niger*. Par ailleurs, la TQ exerce une activité inhibitrice sur huit espèces de dermatophytes (**Aliouat et Boulkelia, 2014**).

5.3. Activité antioxydante

Plusieurs études *in vitro* se sont intéressées à l'activité antioxydante de l'huile essentielle de nigelle. Ses monoterpènes (TQ, carvacrol, t-anéthol et 4 terpinéols) possèdent une activité anti-radicalaire qui peut être mise en évidence par divers procédés. En effet, les extraits éthanolique et aqueux ont retardé l'oxydation des triglycérides de l'huile de maïs à 100°C, la capacité antioxydante des extraits éthanoliques était supérieur aux extraits aqueux. L'activité antioxydante de l'extrait éthanolique est comparable à celle de la tert-butylhydroquinone [2 - (1,1-diméthyléthyl) -1,4-benzènediol], un antioxydant utilisé dans les cosmétiques, et utilisé comme conservateur des acides gras insaturés dans l'alimentation (**Atta et Imaizumi, 1998**).

En 2000, Burits et Bucar se sont intéressés à l'activité antioxydante de l'huile volatile. Ils ont mis en évidence une activité anti-radicalaire de la TQ, du carvacrol, du t-anéthol et du 4- terpinéols. Ils ont neutralisé les radicaux hydroxyles dans la peroxydation lipidique non enzymatique (**Burits et Bucar, 2000**).

5.4. Activité anti-inflammatoire

Plusieurs travaux ont rapporté que la TQ est le principe actif essentiel responsable de l'effet anti-inflammatoire des extraits de *Nigella sativa*; la TQ s'est avérée être un puissant inhibiteur de la thromboxane B2 et des leucotriènes B4 par l'inhibition respective des cyclo-oxygénase et lipo-oxygénase (**E1-Dakhakhny et al., 2002; Hajhashemi et al., 2004**). C'est un inhibiteur efficace de la production des leucotriènes par l'inhibition de la leucotriène-C4-synthase (LT4 synthase) (**Mansour et Tornhamre, 2004**). En 2002, **El Mahmoudy et al.** ont démontré que la TQ inhibe la production de NO par la réduction de l'expression de l'ARNm

du NOS. En 2007, **El Gazzar *et al.***, ont rapporté que la TQ empêche la production de cytokines pro-inflammatoires induit par LPS en bloquant l'expression de facteur de transcription de GATA et l'attache d'instigateur. Le composé empêche la production d'Il-5 induit par LPS et l'expression de l'ARNm de l'Il-13 et la traduction. Cependant, l'activité de l'huile fixe sur les cyclo-oxygénases et lipo-oxygénases est plus importante que la TQ elle-même; l'activité anti-inflammatoire n'est pas donc entièrement due à la présence de la TQ. Des acides gras insaturés de type C20:2 semblent être impliqués (**Houghton *et al.*, 1995 ; Gilani *et al.*, 2004**).

5.5. Activité anticancéreuse

Plusieurs auteurs ont étudié l'éventuelle activité anti tumorale d'extraits ou de composés purs issus des graines de *Nigella sativa*. En 1991, **Salomi *et al.***, ont montré qu'un extrait méthanolique brut, préparé à partir des graines de cette plante, présente une importante action cytotoxique sur le carcinome ascitique d'Ehrlich et sur le lymphome ascitique de Dalton tout en exerçant une cytotoxicité minimale vis-à-vis des lymphocytes normaux. Les graines de *Nigella sativa* ou ses constituants présentent une action préventive des cancers et/ou réductrice de la cytotoxicité des médicaments antinéoplasiques usuels. En effet, la TQ exerce, *in vitro* et *in vivo*, un effet inhibiteur de la carcinogenèse de l'estomac et du fibrosarcome induit par le 20-méthylcholanthrène chez la souris (**Badary *et al.*, 1999 ; Badary et Gamal, 2001**).

Par ailleurs, l' α -hédérine et la TQ exercent d'importantes propriétés anti tumorales vis-à-vis du carcinome du poumon, carcinome épidermoïde du larynx, adénocarcinome du colon et le carcinome du pancréas, d'une manière dose et temps dépendante (**Rooney et Ryan, 2005**).

5.6. Activité sur le système immunitaire

Pour la première fois en 1987, l'effet de *Nigella sativa* sur la réponse immunitaire a été évalué chez des sujets humains volontaires. L'administration de capsules renfermant la poudre de *Nigella sativa* a entraîné, après cinq semaines de traitement, une augmentation de la population LTh(CD4) et a contribué à l'amélioration du rapport cellules T helper/cellules T suppressseurs (CD4/CD8). Par ailleurs, *Nigella sativa* augmente de 30% l'activité des cellules tueuses NK (El-Kadi et Kandil, 1987). Une autre étude a montré que l'extrait aqueux de *Nigella sativa* stimule la réponse lymphocytaire et la production des IL-3 et IL-1 β , cela entraîne une stimulation de l'activité phagocytaire des leucocytes polynucléaires et macrophages (Haqetal., 1995).

5.7. Activité sur le système gastro-intestinal

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

Il a été démontré que l'administration de l'huile fixe à raison de 0.88g/kg/j pendant deux semaines augmente la mucine gastrique et le contenu en glutathion et diminue le taux de l'histamine, sans affecter l'acidité libre et le suc gastrique (El-Dakhakhny et al., 2000). Cette huile ainsi que la TQ protègent contre les lésions gastriques, induites par le processus d'ischémie-reperfusion, grâce à leur pouvoir anti-radicalaire (El-Abhar et al., 2003). L'extrait alcoolique des graines de *Nigella sativa* présente également une activité antiulcéreuse qui a été attribuée aux flavonoïdes qu'il contient (Rajkapooretal., 2002).

Chapitre II : *Clostridium perfringens*

1. Caractéristiques générales de la bactérie

C. perfringens connu auparavant sous le nom de *C. welchii*, a été découverte pour la première fois par Welch et Flexner en 1891 (**Welch et Flexner, 1896**). Au milieu des années 1900, la bactérie avait été impliquée dans certaines maladies gastro-intestinales humaines. Des épidémies d'EN ont été rapportées dans le nord-est de l'Allemagne dans les années qui ont suivi la Seconde Guerre mondiale, cette maladie entérique chez l'homme a été soigneusement étudiée et *C. perfringens* a été identifié comme agent pathogène (**Zeissler et Rassfeld-Sternberg, 1949; Murrell *et al.*, 1966; Johnson et Gerding, 1997**). Chez les animaux plusieurs maladies entériques du bétail (moutons, bovins, chèvres et chevaux), ainsi que l'entérite nécrotique chez les volailles ont été attribuées à *C. perfringens* (**Niilo, 1980; Quinn *et al.*, 1994; Songer, 1997**).

C. perfringens est une bactérie à Gram-positif, large en forme de bâtonnet (1-1.5 μm de diamètre), à extrémité carré, immobile, à métabolisme anaérobie strict mais elle est tolérante dans les milieux microaérophiles, elle possède la capacité de former des spores, cette caractéristique lui confère une plus grande résistance. (**Wells et Wilkins, 1996; Morris et Fernandez-Miyakawa, 2009**). Elle est très ubiquitaire largement répandue dans tout l'environnement (sol, sédiments, eaux d'égout, lisiers, cadavres, poussières, surface des végétaux, etc.). Elle peut aussi être retrouvée dans la flore microbienne intestinale des humains et des animaux, Mais son nombre dans le contenu digestif est faible (**Wells et Wilkins, 1996**). *C. perfringens* est un contaminant fréquent des produits alimentaires, notamment ceux d'origine animale. Ces produits peuvent être contaminés soit lors de la phase d'éviscération à l'abattoir, soit à partir de l'environnement souillé (plan de travail, contact

avec aliments souillés, poussières, etc.) (Nowell *et al.*, 2010), causant ainsi des toxi-infections alimentaires (Wells et Wilkins, 1996).

2. Identification et classification

C. perfringens est une bactérie mésophile, sa croissance optimale s'effectue à des températures variant entre 25 – 40°C, nécessitant des milieux complexes à base de peptone et riches en hydrates de carbone, car la bactérie les fermente pour produire du dioxyde de carbone et de l'hydrogène (Morris et Fernandez-Miyakawa, 2009). Cela est essentiel pour maintenir un environnement anaérobique. Son développement est parmi celle des bactéries se divisant le plus rapidement, avec un temps de génération d'aussi peu que 8 à 20 minutes dans des conditions optimales (Lindstrom *et al.*, 2011). C'est une bactérie glucidolytique (acidification notamment du glucose, lactose, et maltose) et protéolytique. Son isolement nécessite une première inoculation dans un milieu d'enrichissement et une incubation dans un environnement anaérobique pendant 18 - 24h à 37°C. Parmi les milieux d'enrichissement les plus communément utilisés, il y a le *cooked meat medium*, le *brain heart infusion* et le *tryptone glucose yeast* (Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2007). Ensuite une inoculation dans des géloses sélectives telles que le TSN ou le TSC, suivie d'une incubation en anaérobiose pendant 18 - 24 h à 37°C, ces milieux de culture contiennent un critère de différenciation (sulfite de sodium) qui mis en évidence les micro-organismes sulfito-réducteurs qui réduisent le sulfite de sodium en sulfure, provoquant avec le citrate ferrique un précipité noir de sulfure de fer autour des colonies (Harmon, 1984). Les géloses d'agar avec 5% de sang sont aussi utilisées. Les colonies de *C. perfringens* produisent une hémolyse α et une hémolyse β , soit une double hémolyse caractéristique permettant de les identifier (Cruickshank *et al.*, 1975).

C. perfringens est responsable de la synthèse et la sécrétion de plus de 17 différentes toxines. Les souches de *C. perfringens* sont habituellement classées en 5 toxinotypes A, B, C,

D et E en fonction de leurs capacités à produire des toxines possédant une activité létale majeure alpha (α), beta (β), epsilon (ϵ) et iota (i) (Uzal *etal.*, 2014). Cette méthode de classification fut développée en 1931 à partir de tests effectués sur des souris, et est basée sur le pouvoir de létalité du surnageant de cultures pures de chacun des toxinotypes, ainsi que sur la capacité de séroprotection d'anticorps neutralisants isolés de ce même surnageant (Songer, 1996; petit *etal.*, 1999). Le *C. perfringens* de type A est reconnu pour produire la toxine alpha. Le type B produit quant à lui les toxines alpha, bêta et epsilon, seules les toxines alpha et bêta sont produites par les bactéries de type C, tandis que les toxines alpha et epsilon sont associées au type D. La production des toxines alpha et iota caractérise le type E (Tabl 1) (Songer, 1996).

Tableau 1 : Classification des toxinotypes de *C. perfringens* selon les toxines majeures produites.

Toxinotype	Toxines			
	A	B	ϵ	i
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

Suite à la différence des toxines secrétées, les toxinotypes peuvent engendrer plusieurs maladies et infecter différentes espèces, L'EN chez le poulet est causée principalement par le type A produisant la toxine alpha et parfois le type C produisant la toxine alpha et la toxine beta (Enstrom *etal.*, 2003).

Chapitre III: L'entérite nécrotique chez le poulet

1. Étiologie

L'EN est une maladie dont le nom vient du fait que la bactérie provoque, dans les stades les plus avancés de l'infection, une nécrose extensive des villosités intestinales. Cette maladie a été découverte pour la première fois par Bennetts en 1930 en Australie, puis décrite par Parish en 1961 en Angleterre (**Williams, 2005; Martin *et al.*, 2009**), l'agent causal est *C. perfringens* de type A produisant la toxine alpha et parfois le type C produisant la toxine alpha et la toxine beta (**Engtrom *et al.*, 2003**), l'EN n'occupait pas une place prédominante parmi les maladies d'importance chez la volaille (**Williams, 2005**), et cela suite à l'utilisation des antibiotiques à faible dose dans l'alimentation des poulets. Ce n'est qu'après 1997, qu'une recrudescence de cette maladie au sein des élevages a été observée, suite au retrait des promoteurs de croissance dans plusieurs pays (**Cooper et Songer, 2009**). Des experts ont estimé que les couts attribués au traitement et à la prévention de la maladie sont de près de 2.6 milliards de dollars US chaque année surtout sous sa forme sub-clinique qui passe inaperçue pour les éleveurs (**Keyburn *et al.*, 2010a**), les pertes de production associées à cette forme sont principalement dues à une diminution de la conversion alimentaire ainsi qu'aux retards de croissance provoqués par la destruction de la muqueuse intestinale par *C. perfringens*, qui se traduit par une altération de la fonction digestive, cette forme est rencontrée à différents âges, mais elle se manifeste le plus souvent chez les sujets atteignant trois semaines d'âges (**Keyburn *et al.*, 2010a**).

2. Epidémiologie

La maladie a été rapportée dans plusieurs pays, incluant Royaume-uni (**Parish, 1961**), Australie (**Nairn et Bamford, 1967**), Canada (**Helmbold et Bryant, 1971; Long, 1973**) et France (**Casewell *et al.*, 2003**), Les données épidémiologiques sur l'incidence de l'EN sont

limitées, bien que beaucoup d'investigations ont révélé que l'EN était une maladie commune dans le monde (**Van der Sluis, 2000**). **Kalender et Ertas (2005)** ont pu détecter le *C. perfringens* dans 5% des échantillons intestinaux prélevés sur des poulets de chair âgés de 45j provenant de huit troupeaux dans un abattoir en Turquie, une enquête menée par **Hermans et Morgan (2007)** sur 857 fermes au Royaume-Uni a révélé des cas d'EN dans au moins un troupeau en 2006, D'autres investigations menées par **Tschirdewahn *et al.* (1991)**; **Miwa *et al.* (1997)** et **Craven *et al.* (2001)** ont rapporté que *C. perfringens* avait été isolé avec une prévalence de 75 à 95%.

La maladie peut se produire plus d'une fois par an dans une ferme. Au Canada, elle apparaît principalement en juillet, août, septembre et octobre (**Long, 1973**), tandis qu'au Royaume-Uni une fréquence d'apparition d'EN plus élevée en hiver a été enregistrée (**Hermans et Morgan, 2007**). La Norvège a présenté une fréquence similaire au Royaume-Uni avec une incidence maximale pendant l'hiver et une incidence plus faible pendant la saison plus chaude (**Kaldhusdal et Skjerve, 1996**; **Hermans et Morgan, 2007**). Il est généralement reconnu que la maladie n'est pas saisonnière, bien que les divergences d'apparition entre différentes latitudes qui semblent contredire ceci soient encore inexplicables.

3. Source de contamination

C. perfringens est un micro-organisme répandu dans l'environnement des poulets et sa capacité à sporuler lui permet de persister. Il peut se retrouver dans le sol autour des fermes, poussière, la litière, l'alimentation, l'eau, et même dans la flore digestive normale des humains et des animaux (**Craven *et al.*, 2001**; **Miyamoto *et al.*, 2011**). Dans une étude au Brésil, il a été retrouvé à raison de 42% et 30% dans des échantillons d'alimentation et d'eau respectivement (**Schocken-Iturrino *et al.*, 2009**). *C. perfringens* est l'un des premiers

colonisateurs de l'intestin des poussins, avec *E.coli*. Des chercheurs ont rapporté même qu'une transmission verticale à partir de la mère est possible, et les poussins pourraient éclore en ayant un tractus digestif déjà colonisé (**Shane *et al.*, 1984; Williams, 2005**). Le couvoir représente aussi une source de contamination considérable pour les poussins, *C. perfringens* a été isolé à partir de fragments de coquille d'œuf destinés à l'incubation, de duvet des poussins peu après l'éclosion, ainsi que du papier envoyé aux fermes pour y déposer de l'alimentation au sol (**Craven *et al.*, 2001; Craven *et al.*, 2003**). Plus encore, *C. perfringens* a été isolé dans des abattoirs de volaille, et les mêmes ribotypes ont été détectés dans une même chaîne de production suggérant ainsi une transmission des souches entre les différents milieux de production (**Craven *et al.*, 2003**). Il a été aussi montré que la bactérie pouvait être présente dans la viande de poulet en vente au détail, **Nowell *et al.* (2010)** ont pu l'isoler dans 66% des carcasses échantillonnées. Selon **Dhillon *et al.* (2004)**, les mouches peuvent représenter une source possible de contamination pour les poules pondeuses. Des mouches mortes ont été trouvées dans les chaînes d'alimentation et dans les voies intestinales des oiseaux morts, et l'examen bactériologique a révélé la présence des isolats de *C. perfringens*. Ainsi, les mouches peuvent être des porteurs de *C. perfringens*, ce qui entraîne une contamination des aliments ou une inoculation directe par les oiseaux.

4. Pathogénie

Malgré l'importance de l'EN du point de vue clinique et économique sur la production des volailles, la pathogénie de *C. perfringens* et de sa maladie associée n'est pas encore entièrement comprise (**Van Immerseel *et al.*, 2009; Timbermont *et al.*, 2009**). Le jéjunum est le site de prédilection de *C. perfringens* (**Arbuckle, 1972**), bien qu'il soit normalement présent dans le tractus intestinal des poulets sains (**Smith, 1965; Van Immerseel *et al.*, 2009**). Cependant, l'apparition de la maladie peut impliquer un certain nombre de facteurs

prédisposant différents (coccidies, composition de la diète, facteurs immunosuppresseurs). On pense qu'un événement clé dans la pathogénie de l'EN est associé à l'adhésion de *C. perfringens* aux villosités intestinales, car une fois qu'il a été attaché, il commence à proliférer et à produire les toxines qui induisent la nécrose intestinale (**Alsheikhly et Truscott, 1977a; Alsheikhly et Truscott, 1977b; Cooper etsonger, 2009**). Selon **Timbermont *etal.* (2011)** qui ont bien résumé la pathogénie de la maladie. Premièrement, l'infection se traduit par la mort des entérocytes, ce qui entraîne une destruction de l'intégrité cellulaire de la muqueuse intestinale, conduisant ainsi à une fuite du contenu cytoplasmique riche en protéines dans la lumière intestinale, permettant à la bactérie d'avoir un substrat adéquat pour sa croissance. Parmi les principales causes associées à la mort d'entérocytes est la coccidiose, une infection parasitaire due à *Eimeria spp.* La coccidiose intestinale entraîne des dommages aux cellules épithéliales associés à une surproduction de mucus par les cellules à gobelets. Ceci fournit une source de nutriments supplémentaire à *C. perfringens*. Ces deux effets permettent à la bactérie d'obtenir un milieu favorable à sa multiplication (**Timbermont *etal.*, 2011**). **Timbermont *etal.*, 2014** ont démontré que certaines souches virulentes de *C. perfringens* pendant leur phase de multiplication, inhibent la croissance des autres souches grâce à la production de bactériocines. Ainsi, l'examen par PFGE ou par MLST des souches isolées des cas d'EN d'un même élevage a révélé peu de variation entre ces derniers (**Nauerby *etal.*, 2003; Gholamiandekhordi *etal.*, 2006; Chalmers *etal.*, 2008**). Ensuite, les souches virulentes pourraient s'attacher à l'épithélium intestinal en s'adhérant à des molécules de la matrice extracellulaire des cellules comme le collagène de type III ou IV ainsi qu'au fibrinogène (**Timbermont *etal.*,2011**). Finalement, la sécrétion de toxines létales pour les entérocytes produit des dommages intestinaux qui commencent en portion basolatérale des entérocytes pour ensuite se disséminer à toute la lamina propria (**Timbermontet *al.*, 2011**). Il en résulte une nécrose intestinale massive.

5. Signes cliniques

Les signes cliniques associés à l'EN sont peu discriminants ce qui rend l'identification de la maladie ardue. Les oiseaux sont généralement atteints par la maladie dans les élevages de poulets de chair entre deux et six semaines d'âge (**Opengart, 2008**), mais la maladie peut aussi être observée chez des oiseaux âgés de plus de six mois. Des cas ont été rapportés chez des poules pondeuses de 3 à 6 mois élevées au sol, des poules pondeuses de remplacement élevées en cage de 12 à 16 semaines et chez des poules pondeuses en cage en phase de production (**Opengart, 2008**).

La forme aiguë de la maladie se traduit par de l'abattement, la déshydratation des oiseaux, des plumes ébouriffées, une diarrhée liquide et brunâtre, ainsi qu'une diminution de la consommation alimentaire. Ces signes sont généralement de très courte durée et précèdent souvent la mort de l'oiseau (**Opengart, 2008; Shojadoost et al., 2012; Cooper et al., 2013**). Dans la forme suraiguë, aucun signe clinique n'est observé et les oiseaux sont tout simplement retrouvés morts au sol. La mort des oiseaux peut survenir en 1 ou 2 h et la mortalité totale du troupeau peut atteindre 50% (**Timbermont et al., 2011**). Le problème majeur lié à l'EN est sa forme sub-clinique qui se caractérise par une mauvaise conversion alimentaire, il en résulte une diminution du gain de poids et/ou une perte de poids chez les poulets de chair, ainsi qu'une possible augmentation des condamnations à l'abattoir, surtout à cause d'une augmentation des cas d'hépatites associés à *C. perfringens* (**Lovland et Kaldhusdal, 2001**).

6. Lésions macroscopiques

Les changements caractéristiques observés liés à des cas d'EN lors de la nécropsie reposent sur la présence des lésions entériques nécrotiques et hémorragiques de la muqueuse intestinale (**Brennan et al., 2001**). Dans la forme classique de l'EN, l'intestin présente une

odeur nauséabonde avec des parois minces et friables et souvent distendus par du gaz, les lésions peuvent être réparties tout au long de l'intestin, les portions majoritairement atteintes sont le duodénum, jéjunum, iléon et à moindre degré les caeca (**Opengart, 2008; Timbermont *et al.*, 2011**). Un agglomérat composé de tissus intestinaux nécrosés et de débris cellulaires forme à la surface de la muqueuse une pseudomembrane dont la couleur varie du gris brun au jaune brun nommée membrane diphtérique qui est une lésion caractéristique des cas d'EN de terrain, mais elle n'est pas rapportée dans la littérature lors d'infection expérimentale. Alors que des lésions focales à multifocales de zones nécrotiques de taille variable, localisées à coalescentes, ont été décrites lors d'infection expérimentale (**Keyburn *et al.*, 2013a; Keyburn *et al.*, 2013b**). Dans la forme sub-clinique, on observe essentiellement une baisse des performances dans les élevages qui peut être associée à une hépatite ou une cholangiohépatite se traduisant par un foie qui devient plus gros, ferme et verdâtre avec apparition de foyers pâles multifocaux disséminés dans le parenchyme hépatique (**Lovland et Kaldhusdal, 2001; Van Immerseel *et al.*, 2004**).

7. Diagnostic

Un diagnostic de l'EN devrait être basé sur plusieurs critères, et il n'y a pas un seul test ou examen qui peut confirmer ce diagnostic (**Cooper *et al.*, 2013**). Lors de l'examen post-mortem, les lésions de nécrose focales, multifocales ou diffuses affectant l'intestin grêle et parfois le caecum sont très suggestifs de l'EN. Cependant, ces lésions ne sont pas pathognomoniques pour cette maladie, et un diagnostic final ne peut pas être basé sur observation seulement de ces dernières. L'histologie est également utile pour établir un diagnostic présomptif de l'EN, mais comme c'est le cas avec des lésions macroscopiques, il ne peut pas être utilisé pour établir un diagnostic final. Cependant, l'histologie est particulièrement utile pour exclure d'autres conditions telles que la coccidiose (**Ficken**

etal.,1997). L'isolement de *C. perfringens* de type A à partir du tractus intestinal peut également être utile pour établir un diagnostic de l'EN, bien que c'est rare où ce micro-organisme n'est pas isolé de ce dernier. *C. perfringens* peut être isolé sur gélose TSC et doit être incubé en anaérobiose pendant 24 à 48 h à 37 °C. Les colonies auront une apparence noire (**Gharaibeh *etal.*,2010**). Ce micro-organisme peut également être isolé sur plusieurs autres milieux anaérobiques classiques, tel que le bouillon de Thioglycollate, la gélose au sang et d'autres. Cependant, parce que *C. perfringens* de type A est présent dans presque tous les oiseaux sains, son isolement n'est pas diagnostique pour l'EN. En outre, la découverte de toxines autres que la toxine α qui peut produire l'EN, oblige à revoir la question de l'utilisation de la détection de *C. perfringens* de type A seule pour le diagnostic de l'EN. Dans des recherches plus récentes, la détection du gène *netB* est importante car la toxine NetB reliée à ce gène peut induire l'EN sans que le gène *cpa* soit présent (**Keyburn *et al.*, 2006; Keyburn *etal.*, 2008**). Par contre, certaines souches de *C. perfringens* ne possédant pas le gène *netB* ont aussi la capacité d'induire des lésions d'EN (**Cooper et Songer, 2010**). Donc, la détection du gène *netB* dans les souches de *C. perfringens* isolées de cas d'EN n'est pas un diagnostic complètement fiable.

8. Traitement

Plusieurs classes d'antibiotiques sont efficaces contre les bactéries à Gram-positif comme *C. perfringens*, dont les pénicillines, les céphalosporines, la vancomycine, les tétracyclines, les macrolides, le chloramphénicol, les sulfamides et le triméthoprime. Un épisode classique d'entérite nécrotique clinique est traité efficacement par plusieurs antibiotiques. Parmi les antibiotiques utilisés dans l'eau de boisson, il y a la lincomycine, la bacitracine, l'oxytétracycline, la pénicilline et la tylosine (**Eric Parent, 2015**).

Matériel
Et
Méthodes

1. Objectif

L'objectif de notre étude est d'évaluer, *in vitro*, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Nigella sativa* vis-à-vis du *C. perfringens* de type A responsable d'EN chez le poulet de chair.

Notre étude se divise en deux parties :

- Extraction de l'huile essentielle de *Nigella sativa*.
- Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Nigella sativa* sur le *C. perfringens* de type A.

2. Lieu et période de travail

La première partie du travail a été effectuée au niveau du laboratoire de biochimie, Institut des Sciences Vétérinaires, Tiaret, et la deuxième partie a été programmée au niveau du laboratoire d'hygiène et pathologie animale, Institut des Sciences Vétérinaires, Tiaret. Durant une période de deux mois (1 Mars au 15 Mars 2020).

3. Matériel

3.1. Matériel végétal

Les graines de *Nigella sativa* utilisées dans cette étude (**Fig.2**) se trouvent sur le marché tout au long de l'année, elles ont été achetées chez une herboristerie située à Tiaret. Ces graines ont d'abord été séchées pendant 15 j à l'air libre, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Ensuite, elles ont été nettoyées et broyées.



Figure2. Graines de *Nigellasativa*.

3.2. Matériel de laboratoire

Le matériel utilisé au niveau de laboratoire est présenté dans le tableau suivant :

Tableau2. Verreries et appareillage. (Annexe)

Verreries et autres	Appareillage
Ballon 500ml, Ampoule à décantation, Béchers, Boites de Pétri, Flacons, Micropipette, Papiers Wattman, Pipettes de Pasteur, Pince, Tubes à essais, Verre de montre, Pissette, Eprouvette, Eau de javel Alcool	Autoclave (Sanoclav) Agitateur (Stuart) Balance (Sartorius) Spectrophotomètre (NovaspecII) Vortex (Techno kartel) Incubateur (Mettler) Stérilisateur (Heraeus) Réfrigérateur (Condor) Jar d'anaérobiose (Oxoid)

3.3. Souche bactérienne testée

Pour évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Nigella sativa* sur le *C. perfringens*, nous avons utilisé une souche toxigène de *C. perfringens* de type A isolée à partir de cas d'EN du terrain chez le poulet de chair fournis par Dr Merati Rachid (Merati *et al.*,

2017). La souche est conservée sous forme lyophilisée (Fig.3), et stockées à + 4°C au laboratoire d'hygiène et pathologie animale, Institut des Sciences Vétérinaires, Tiaret.



Figure 3. La souche toxigène de *C. perfringens* de type A sous forme lyophilisée.

4. Méthodes

4.1. Protocole expérimental

Le protocole expérimental utilisé dans ce travail est représenté comme suite :

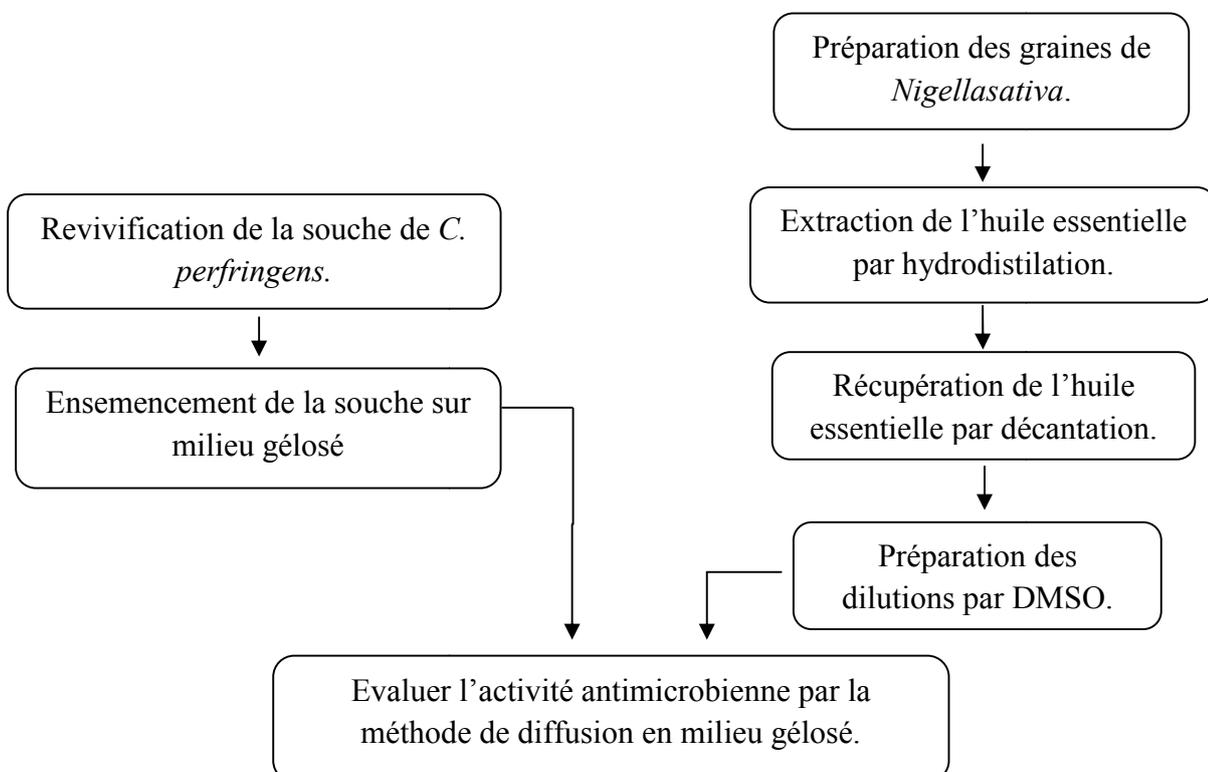


Figure 4. Protocole expérimental.

4.2.Extraction de l'huile essentielle

4.2.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est un mode d'extraction qui a été proposé par Garnier en 1891, c'est la méthode la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements (**Bruneton, 1999**).

Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon rempli d'eau distillée placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Cette opération est réalisée grâce à un montage nommé: Hydrodistillateur (**Fig.5**).

4.2.2. Description de l'extraction de l'huile essentielle

Une masse végétale de 200 à 400 g est placée dans un ballon en verre pyrex, additionnée de 600 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, lors de l'apparition de la première goutte du distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur (on attend 1 heure et 30 min), l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par un condensateur, fixé par un support approprié en position horizontale inclinée légèrement pour faciliter l'écoulement du distillat. Après un maximum d'extraction d'huile essentielle, la partie huileuse flottante est récupérée grâce à une ampoule à décanter puis déshydratée sur du sulfate de magnésium ($MgSO_4$). En fin, l'huile essentielle est pesée pour le calcul du rendement, et conservée ensuite à 4 °C dans un flacon sombre afin de la préserver de la lumière et de la chaleur (**Bayala, 2014**).

4.2.3. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement est calculé selon la norme **AFNOR(1986)** qui dit que le rendement en huile essentielle (Rd), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est donné par la formule suivante :

$$\mathbf{Rd = M'/M.100}$$

Rd: Rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%).

M': Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g).

M: Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g).



Figure5.L'appareil utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation.

4.3. Préparation des dilutions à tester de l'huile essentielle de *Nigellasativa*

Pour tester l'activité antibactérienne de l'huile essentielle, on doit d'abord procéder à sa solubilisation dans du sulfoxyde de diméthyle (DMSO). Une solution mère de l'huile essentielle est préparée en utilisant du DMSO dissous dans de l'eau distillée stérile (1/9, v/v), à partir de laquelle on prépare des solutions finales par double dilution.

Les différentes solutions à tester sont préparées à partir de la solution mère par dilution en série dans des tubes à essai stériles pour atteindre des concentrations en huile essentielle de: (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 et 1/320).

4.4. Préparation de la souche bactérienne

Pour la revivification, la souche de *C. perfringens* a étéensemencée dans un tube contenant du milieu viande cuite (Oxoid, UK) et incubés en anaérobiose à 37 °C pendant 24 h pour enrichissement. Par la suite, la culture a été ensemencée sur gélose TSC (Oxoid, UK) et incubée en anaérobiose à 37 °C pendant 24-48 h (Harmon, 1984). Les colonies noires typiques, supposées être *C. perfringens* ont été repiquées et inoculées dans du bouillon au Thioglycolate (Oxoid, UK), puis conservées à 4 °C.

4.5. Évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé

La méthode de diffusion en milieu gélosé ou l'aromatogramme est une technique semblable à l'antibiogramme. La technique utilisée dans cette étude est une modification de la méthode de Fauchère et Avril (2002). Elle consiste à déposer un disque stérile de papier filtre imbibé d'huile essentielle, sur un tapis microbien et de mesurer ensuite la zone où les microorganismes n'ont pas pu se développer. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, est ainsi déterminé comme un halo translucide autour du disque.

Pour ce faire, une suspension bactérienne de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (10^8 UFC/ml) est préparée à l'aide d'un spectrophotomètre, en mettant quelques colonies bactériennes en suspension dans une solution saline (0,9% NaCl). Les boîtes de Pétri contenant le milieu de culture gélose au sang frais (gélose nutritive + 5% de sang de mouton

défibriné) (Biokar, France) sontensemencées en nappe avec l'inoculum. A la surface dechaque boîte, des disques de papier filtre (Wattman n°4) stérilede 6 mm de diamètre imbibé avec 20 µLde chaque concentration de l'huile essentielle de *Nigellasativas*sont déposés, un disque imbibé de 20 µL de DMSO est utilisécomme témoin négatif sur la même boîte.

Les boîtes sont laissées une heure à température ambiante pour permettre la diffusion de l'huile essentielle, puis ellesont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 18 à 24 h. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres, disque inclus.

La sensibilité aux différents huiles essentielles est classée selon le diamètre de l'halot de la zone d'inhibition : insensible (-) si le diamètre de la zone d'inhibition est moins de 8mm ; sensible (+) avec des diamètres compris entre 9 et 14 mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm ; et extrêmement sensible (+++) pour des diamètres plus de 20 mm (**Ponce *etal.*, 2003**).A noter que les tests sont réalisés en triplicata.

Résultats et Discussion

Résultats et discussion

Plusieurs études effectuées dans différentes régions du monde ont démontré la résistance des isolats de *C. perfringens* à différents antibiotiques, utilisés pour le traitement ou comme promoteurs de croissance dans l'alimentation pour la prévention contre l'EN chez les volailles (Johansson *et al.*, 2004 ; Gholamiandehkordi *et al.*, 2009 ; Gharaibeh *et al.*, 2010 ; Slavic *et al.*, 2011). Ainsi, depuis l'interdiction de l'utilisation de ces antibiotiques, de nombreuses études ont été publiées décrivant des stratégies alternatives. Un accent particulier a été mis sur la prévention de l'EN chez les volailles causée par *C. perfringens* par l'utilisation de plantes ou de produits dérivés de plantes (Caly *et al.*, 2015). Cependant, à notre connaissance, aucune étude sur l'effet antibactérien de *Nigella sativa* vis-à-vis du *C. perfringens* induisant l'EN chez les poulets de chair n'a été réalisée en Algérie.

Dans la présente étude, l'objectif était d'évaluer, *in vitro*, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Nigella sativa* vis-à-vis du *C. perfringens* de type A responsable d'EN chez le poulet de chair. Suite aux difficultés rencontrées durant la réalisation de la partie expérimentale, nous n'avons pas pu obtenir des résultats. Nous discuterons ainsi dans cette partie, en générale, l'effet antibactérien de *Nigella sativa*.

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses recherches ont été menées sur l'effet des extraits de la graine de Nigelle ou bien de ces composés, *in vivo* ou *in vitro*, en raison de leur large spectre d'activités biologiques. Khan (1999) ont rapporté, dans une étude réalisée sur plusieurs bactéries, que l'huile essentielle de *Nigella sativa* peut inhiber la croissance des bactéries Gram positif et négatif sauf certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*, suggérant ainsi que les composés phénoliques présents dans l'huile seraient responsables de cet effet antibactérien. Une étude *in vitro* par la méthode de diffusion sur disque a mis en évidence la forte activité inhibitrice de l'huile essentielle diluée au centième contre plusieurs

bactéries dont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Vibrio cholerae*, avec une plus forte action sur les bactéries Gram (+) (**Ali et Blunden, 2002**). Une autre étude de l'huile essentielle sur 37 entérobactéries, dont *Shigella spp.*, a permis de déterminer les concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀) sur les différents microorganismes; elles vont de 50 à 400 µg/ml (**Ferdous et al., 1992**).

L'effet antibactérien de l'huile essentielle à une concentration de 4,4 mg/ml s'est révélé être aussi efficace, voire plus efficace, que l'amoxicilline à 20 µg/ml sur les bactéries Gram (+) comme *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, et sur les Gram (-) telles que *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'effet a été maximal contre *Bacillus subtilis* (**El-Kamali et al., 1998**).

En ce qui concerne l'extrait méthanolique de *Nigella sativa*, une forte action inhibitrice, avec une IC₅₀: 10-30 µg/ml, contre *Streptococcus mutans* a été enregistrée dans une étude réalisée par **Ferdous et al. (1992)**. Par ailleurs, une autre expérience confirma cette activité inhibitrice contre *Streptococcus mutans* qui représente la bactérie la plus souvent en cause dans l'apparition des caries et de la plaque dentaire (**Khan, 1999**).

L'extrait de *Nigella sativa* obtenu par l'éther a également montré une activité antibactérienne sur les bactéries Gram positif et négatif (**Sokmen et al., 1999**). En 1991, **Hanafy et Hatem** ont étudié l'extrait par le diéther de la graine de nigelle sur plusieurs micro-organismes. Une inhibition de leur croissance dépendante de la concentration de l'extrait a été observée. Une application *in vivo* sur une *staphylococcie* sous-cutanée de rat a été réalisée; l'injection de l'extrait cité par voie locale a éradiqué les bactéries (**Hanafy et Hatem, 1991**). Les mêmes chercheurs ont remarqué une action synergique de l'extrait méthanolique avec les antibiotiques tels que la streptomycine et la gentamycine. L'extrait méthanolique ainsi que l'extrait aqueux ont été actifs sur les micro-

organismes isolés dans l'arthrite septique. Les souches résistantes aux antibiotiques de *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* et *Shigella dysenteriae*, n'ont pas résisté aux extraits étudiés (**Morsi, 2000**).

Il a été aussi démontré que la TQ, le principe actif le plus abondant de *Nigella sativa*, possède une activité antibactérienne contre plusieurs bactéries anaérobiques (*C. perfringens*, *C. difficile*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*) responsables de certaines pathologies chez les humains. Le TQ était, en particulier, plus efficace contre *C. difficile*, qui est relativement commun pour provoquer de la diarrhée chez les personnes immunodéprimées et celles prenant des antibiotiques à large spectre (**Randhawa et al., 2017**).

L'huile végétale de *Nigella sativa* se voit aussi attribuer des propriétés antibactériennes, notamment dans la conservation des aliments. En 1999, des chercheurs ont montré que l'emploi de l'huile de nigelle dans la conservation des aliments à une teneur de 0,1% inhibe la croissance de micro-organismes (**Khan, 1999**). En 2005, une étude a été réalisée dans le but de vérifier l'action de l'huile de nigelle sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes*. L'effet antibactérien de l'huile de *Nigella sativa* a été comparé à celui de la gentamycine et à une huile végétale, par la méthode de diffusion sur disque. L'huile végétale de nigelle a montré la plus forte activité antibactérienne, elle a été active sur toutes souches de *Listeria monocytogenes*, la gentamycine a eu un effet moins marqué, et l'huile végétale quant à elle n'a eu aucun effet (**Nair et al., 2005**). La même année une équipe turque complète cette étude en comparant l'huile de nigelle à différentes concentrations sur différentes bactéries retrouvées dans les aliments. Ce sont les bactéries responsables de toxi-infections alimentaires, celles qui altèrent les aliments, celles retrouvées dans le lait cru de vache, mais aussi les lactobacilles jouant un rôle important dans la conservation des produits carnés et de la charcuterie, qui ont été étudiées. Les

résultatsmontrent que l'huile végétale agit contre toutes les bactéries et à toutes les concentrations (0,5, 1 et 2%). L'effet est plus marqué à la concentration la plus forte, et il est à noter que leslactobacilles ont été les plus résistants (**Aliet Blunden, 2002**). L'huile de nigelle pourrait à l'avenir se substituerà certains agents conservateurs chimiques.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

D'après les résultats des différentes recherches réalisées sur l'effet antibactérien de *Nigella sativa*, nous pouvons conclure, dans la présente étude, que cette plante possède plusieurs constituants actifs qui peuvent jouer un rôle important dans la lutte contre un nombre considérable de bactéries, nous suggérons ainsi que *Nigella sativa* pourrait peut-être avoir un effet antibactérien contre le *C. perfringens* de type A isolé à partir de cas d'EN chez le poulet de chair.

Les observations faites pendant cette étude ont permis de répondre à certaines interrogations, mais ont aussi contribué à soulever d'autres questionnements.

Il serait intéressant de mener d'autres investigations sur un plus grand nombre d'isolats de *C. perfringens* multi résistants aux antibiotiques.

Des études ultérieures devraient en outre essayer d'identifier et de préciser les différents principes actifs de *Nigella sativa* et mieux comprendre leur mode d'action.

Enfin, il semble être nécessaire de confirmer l'activité antibactérienne des différents extraits de cette plante *in vivo*, sans oublier l'étude de la toxicité éventuelle qui peut être provoqué par les différentes doses de cette dernière.

Références

A

- Adams V., Han X., Lyras D. et Rood J.I., 2018.** Antibiotic resistance plasmids and Mobile genetic elements of *clostridiumperfringens*. Plasmid 99, 32_39. Doi: 10.2016/j. Plasmid. 2018.07.002.
- AFNOR, 1986.** Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », Ed. AFNOR, Paris, 57. P.
- Ahmad A., Husain A., Mujeeb M., et al., 2013.** A review on therapeutic potential of *Nigellasativa*: a miracle herb. Asian Pac J Trop Biomed, 3, 337-52.
- Ali Benhaddou Andaloussi., 2009.** Étude des propriétés antidiabétiques de *Nigella sativa* : sites d'action cellulaires et moléculaires.
- Ali B. et Blunden G., 2002.** Pharmacological and Toxicological properties of *Nigella sativa*. Phytother Res, 15, 59-69.
- Aliouat Assia et Boulkelia Noussaiba, 2014.** Activité antioxydant des extraits des graines de la plante *Nigelle sativa L.* Mémoire de master. Faculté de Science de la Nature et de la Vie. Université de Constantine 1. 48 pages.
- Alsheikhly F. et Truscott R.B., 1977a.** Interaction of *Clostridium Perfringens* and Its Toxins in Production of Necrotic Enteritis of Chickens. Avian. Dis. 21, 256-263.
- Alsheikhly F. et Truscott R.B., 1977b.** Pathology of Necrotic Enteritis of Chickens Following Infusion of Broth Cultures of *Clostridium perfringens* into duodenum. Avian. Dis. 21, 230-240.
- Arbuckle J.B.R., 1972.** The attachment of *Clostridium welchii* (*C. perfringens*) type C to intestinal villi of pigs. J. Pathol. 106.
- Arici M., Sagdic O. et Gecgel U., 2005.** Antibacterial effect of Turkish black cumin (*NigellasativaL.*) oils. Grasas y Aceites, 56, 259-262.
- Atta M. et Imaizumi K., 1998.** Antioxidant Activity of *Nigella sativa L.* Seeds Extracts. J Jap Oil Chem Soc. 47 (5): 475-480.

B

Badary O.A., Al-Shabanah O.A., Nagi M.N., Al-Rikabi A.C. et Elmazar M.M., 1999. Inhibition of benzo (a) pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone. *European Journal of Cancer Prevention*, **8**: 435-440.

Badary O.A. et Gamal A.M., 2001. Inhibitory effects of thymoquinone against 20 methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer Detection and Prevention Journal*, **25**: 362-368.

Bayala Bagora, 14 October 2014. Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes.

Brennan J., Moore G., Poe S.E., Zimmermann A., Vessie G., Barnum D.A. et Wilson J., 2001. Efficacy of in-feed tylosin phosphate for the treatment of necrotic enteritis in broiler chickens. *Poult. Sci.* **80**, 1451-1454.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. *3ème Ed. Tec et Doc Lavoisier. Paris.* 1120-1121 pp.

Burits M. et Bucar F., 2000. Antioxydant activity of *Nigella sativa L.* essential oil. *Phytother Res.* **14 (5)**: 323-328.

C

Caly D.L., D’Inca R., Auclair E., Drider D., 2015. Alternatives to Antibiotics to Prevent Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Microbiologist’s Perspective. *Front. Microbiol.* **6**, 1336. doi:10.3389/fmicb.01336.

Casewell M., Friis C., Marco E., McMullin P. et Phillips I., 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 159-161. Doi: 10.1093/jac/dkg313.

Chalmers G., Bruce H.L., Hunter D.B., Parreira V.R., Kulkarni R.R. et Jiang Y.F., 2008. Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from

necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. J. Clin. Microbiol. 46(12), 3957-3964. Doi:10.1128/JCM.01548-08.

Cheikh-Rouhou S., Besbes S., Lognay G., Blecker C., Deroanne C. et Attia H., 2008. Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halpensis* Mill.) seed oils. J Food Comp Anal. 21(2): 162-168.

Cooper K.K. et Songer J.G., 2009. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. Anaerobe. 15, 55-60. Doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.01.006.

Cooper K.K. et Songer J.G. 2010. Virulence of *Clostridium perfringens* in an experimental model of poultry necrotic enteritis. Vet. Microbiol. 142, 323-328. Doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.065.

Cooper K.K., Songer J.G. et Uzal F.A., 2013. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. J. Vet. Diagn. Invest. 25, 314-327. Doi: 10.1177/1040638713483468.

Craven S.E., Stern N.J., Bailey J.S. et Cox N.A., 2001. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. Avian. Dis. 45, 887-896.

Craven S.E., Cox N.A., Bailey J.S. et Cosby D.E., 2003. Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. Avian. Dis. 47, 707-711.

C R Biol, 2008. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. Shoots and roots. 331(1): 48-55.

Cruickshank R., Duguid J.P., Marimo B.R. et Swain R.H., 1975. In: Medical Microbiology 12th ed. Vol. II, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York.

D

Dhillon A.S., Roy P., Lauerma L., Schaberg D., Weber S., Bandli D. et Wier. F., 2004.

High mortality in egg layers as a result of necrotic enteritis. *Avian. Dis.* 48, 675-80.

ε

Eid S., El Atfeh N.M., Amer F., Tolba H.N. et Hamed R.I., 2020. Prevention of Necrotic Enteritis in Broiler Chickens by Prebiotics and Probiotics VS Control by Antibiotics, *in Vivo Study. Alexandria Journal of Veterinary Sciences.* 64 (1). 143-153. Doi: 10.5455/ajvs.76994.

El-Abhar H.S., Abdallah D.M. et Saleh S., 2003. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by Ischaemia/reperfusion in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 84: 251-258.

El-Dakhakhny M., Barakat M., Abd El-Halim M. et Aly S.M., 2000. Effect of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 72: 299-304.

El-Dakhakhny M., Madi N.J., Lember N. et Ammon H.P.T., 2002. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology,* 81: 161-164.

El Gazzar M.A., El Mezayen R., Nicolls M. R. et Dreskin S.C., 2007. Thymoquinone attenuates proinflammatory responses in lipopolysaccharide-activated mast cells by modulating NFkappaB nuclear transactivation. *Biochimica and Biophysica Acta,* 1770: 556–564.

El kadi A. et Kandil O., 1987. The black seed (*Nigella sativa*) and immunity: Its effects on human T cell subsets. *Fed Proc,* 46, pp. 1222.

El-Kamali H., Ahmad H., Mahammad A., Yahia A., El-Tayeb A. et Ali A., 1998. Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds. 69, 77-78.

El-Mahmoudy A., Matsuyama H., Borgan M.A., Shimizu Y., El-Sayed M.G., Minamoto N. et Takewaki T., 2002. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *International Immunopharmacology*, 2: 1603–1611.

Enstrom B.E., Fermer C., Lindberg A., Saarinen., Baverud A. et Gunnarsson A., 2003. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet. Microbiol.* 94, 225-235.

Eric Parent, Août 2015. Caractérisation et évaluation de la virulence de souches cliniques de *Clostridium perfringens* chez le poulet à griller élevé sans antibiotique.

7

Fauchère J.L., Avril J.L., 2002. Bactériologie générale et médicale. Ellipses Editions Paris. p 365.

Ferdous A., Islam S., Ahsan M., Hasan C. et Ahmad Z., 1992. *In vitro* antibacterial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds against multiple drug – resistant isolates of *Shigella* species and isolates of *Vibrio cholerae* and *E. coli*. *Phytother Res*, 6 (2), pp. 137-140.

Fernandez-Miyakawa M.E., Marcellino R. et Uzal F.A., 2007. *Clostridium perfringens* type A toxin production in 3 commonly used culture media. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 184-186. Doi: 10.1177/104063870701900208.

Ficken M.D. et Wages D., 1997. Necrotic enteritis. In: *Diseases of poultry* 10th ed. Iowa State University Press, London. pp. 261–264.

Fisher D.J. Miyamoto K., Harrison B., Akimoto S., Sarker M.R. et McClane B.A., 2005. Association of beta 2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastro - intestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Vet Microbiol*, 56, 747-762. Doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04573.x.

9

Gharaibeh S., Al Rifai R. et Al-Majali A., 2010. Molecular typing and antimicrobial

susceptibility of *Clostridium perfringens* from broiler chickens. *Anaerobe*. 16, 586–589.

Ghedira K., 2006. La nigelle cultivée: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 4: 1-7.

Gholamiandekhordi A.R., Ducatelle R., Heyndrickx M., Haesebrouck F. et Van Immerseel F., 2006. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet. Microbiol.* 113, 143-152. Doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.023.

Gholamiandekhordi A., Eeckhaut V., Lancriet A., Timbermont L., Bjerrum R., Ducatelle F., Haesebrouck, Van Immerseel F., 2009. Antimicrobial resistance in *Clostridiumperfringens* isolates from broilers in Belgium. *Veterinary Research Communications*. 33:1031.1037.DOI:10.1007/s11259-009-9306-4.

Gilani A.H., Jabeen Q. et Khan M.A.U., 2004.A review of medecinal uses and pharmacological activites of *Nigella sativa*. *Pakistan journal of biologicalsciences*.7: 441-451.

Goreja W.G., 2003. Black seed: nature's miracle remedy. New York, NY 7 Amazing Herbs Press.

#

Hajhashemi V., Ghannadi A. et Jafarabadi H., 2004.Black Cumin Seed Essential Oil, as a Potent Analgesic and Anti-inflammatory Drug. *Phytotherapy Research*. 18:195–199.

Hanafy M. et Hatem M., 1991. Studies on the antimicrobial activity of Black seed. *J Ethnopharmacol*, 34 (2/3), pp. 275-278.

Hannan A., Saleem S., Chaudhary S., Barka M. et Arshad M.U., 2008. Anti-bacterial activity of *Nigellasativa* against clinicalisolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 20(3):72–74.

Haq A., Abdullatif M., Lobo P.I., Khabar K.S., Sheth KV. Et al-Sedairy S.T., 1995. *Nigellasativa*: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte

phagocytic activity. *Immunopharmacology*, **30**, pp.147-155.

Harmon S., 1984. *Clostridium perfringens*: enumeration and identification. In: FDA Bacteriological Analytical Manual. Association of Official Analytical Chemists., Arlington, VA. pp 1701-1710.

Helmboldt C.F. et Bryant E.S., 1971. Pathology of Necrotic Enteritis in Domestic Fowl. *Avian Dis.* 15(4), 775-780. Doi: 10.2307/1588866.

Hermans P.G., Morgan K.L., 2007. Prevalence and associated risk factors of necrotic enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey. *Avian. Pathol.* 36, 43-51.

Houghton P.J., Zarka R., De Las Heras B. et Hoult J.R., 1995. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*, **61**: 33-36.

Hume M.E., 2011. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. *Poult. Sci.* 90(11), 2663-2669. Doi: 10.3382/ps.2010-01030.

Q

Johnson S. et Gerding D.N., 1997. Enterotoxemic infections. In: *The clostridia: molecular biology and pathogenesis*. Academic Press, London, San Diego, CA. pp. 117-140.

Johansson A., Greko C., Engstrom B.E., Karlsson M., 2004. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry and distribution of Tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology*.99(3-4):251-257. DOI: 10.1016/j.vetmic.

Jukes T.H., Hill D.C. et Branion H.D., 1956. Effect of feeding antibiotics on the intestinal tract of the chick. *Poult. Sci.* 35, 716-723. Doi: 10.3382/ps.0350716.

R

Kaldhusdal M. et Skjerve E., 1996. Association between cereal contents in the diet and

incidence of necrotic enteritis in broiler chickens in Norway. *Prev. Vet. Med.* 28, 1-16.

Kalender H. et Erta H.B. 2005. Isolation of *Clostridium perfringens* from chickens and detection of the alpha toxin gene by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 847-851.

Keyburn A.L., Bannam T.L., Moore R.J. et Rood J.I., 2010a. NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins (Basel)*. 2, 1913-1927. Doi: 10.3390/toxins2071913.

Keyburn A.L., Boyce J.D., Vaz P., Bannam T.L., Ford M.E. et Parker D., 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS. Pathog.* 4(2), e26.

Keyburn A.L., Portela R.W., Ford M.E., Bannam T.L., Yan X.X. et Rood J.I., 2013a. Maternal immunization with vaccines containing recombinant NetB toxin partially protects progeny chickens from necrotic enteritis. *Vet. Res.* 44, 108. Doi: 10.1186/1297-9716-44-108.

Keyburn A.L., Portela R.W., Sproat K., Ford M.E., Bannam T.L. et Yan X., 2013b. Vaccination with recombinant NetB toxin partially protects broiler chickens from necrotic enteritis. *Vet. Res.* 44, 54. Doi: 10.1186/1297-9716-44-54.

Keyburn A.L., Sheedy S.A., Ford M.E., Williamson M.M., Awad M.M., Rood J.I. Et Moore R.J., 2006. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect. Immun.* 74, 6496-6500. Doi: 10.1128/IAI.00806-06.

Khan M., 1999. Chemical composition and medicinal properties of *Nigellasativa* Linn. *Inflammo-pharmacology*, 7 (1), 15-35.

Khan M.A., Ashfaq M.K., Zuberi H.S., Mahmood M.S. et Gilani A.H., 2003. The *in vivo* antifungal activity of the aqueous extract from *Nigellasativa* seeds. *Phytother Res.* 17:183–186.

Khare C.P., 2004. Encyclopedia of Indian medicinal plants. New York: Springes-Verlag

Berlin Heidelberg.

ℒ

Lindstrom M., Heikinheimo A., Lahti P. et Korkeala H., 2011. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food microbiol.* 28(2), 192-198. Doi: 10.1016/j.fm.2010.03.020.

Long J.R., 1973. Necrotic Enteritis in Broiler Chickens .1. Review of Literature and Prevalence of Disease in Ontario. *Can. J. Comp. Med.* 37(3), 302-308.

Lovland A. et Kaldhusdal M., 2001. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. *Avian. Pathol.* 30, 73-81. Doi: 10.1080/03079450020023230.

ℳ

Mansour M. et Tornhamre S., 2004.Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19: 431-436.

Martin T.G. et Smyth J.A., 2009.Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridiumperfringens* from animals in the United States. *Vet. Microbiol.* 136(1-2), 202-205.Doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.026.

Merati R, Temim S, Mohamed AAA., 2017.Identification and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from necrotic enteritis in broiler chickens in Tiaret, Western Algeria. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi.* 2017;23(4):595-601. DOI: 10.9775/kvfd.2017.17431

Miwa N., Nishina T., Kubo S. et Honda H., 1997.Most probably numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 59, 557-560.

Miyamoto K., Yumine N., Mimura K., Nagahama M., Li J. et McClane B.A., 2011.

Identification of novel *Clostridium perfringens* type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene. PLoS One. 6(5):e20376.

Morris W.E. et Fernandez-Miyakawa M.E. 2009.Toxins of *Clostridium perfringens*. Rev. Argent. Microbiol. 41, 251-260.

Morsi N., 2000. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. Acta Microbiol Pol. 49(1):63–74.

Murrell T.G.C., Egerton J.R., Rampling A., Samels J. et Walker P.D., 1966. The ecology and epidemiology of the pig-bel syndrome in man in New Guinea. J. Hyg. Camb. 64(3), 375-396.

Mwangi S., Timmons J., Fitz-Coy S. et Parveen S., 2019. Characterization of *Clostridium perfringens* recovered from broiler chicken affected by necrotic enteritis. Poultry Science. 98 (1). 128–135. DOI:10.3382/ps/pey332.

N

Nairn M.E. et Bamford V.W., 1967. Necrotic enteritis of broiler chickens in Western Australia. Aust. Vet. J. 43, 49-54.

Nair M., Vasudevan P. et Venkitanarayanan K., 2005. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. Food Control, 16, 395 -3.

Nauerby B., Pedersen K. et Madsen M., 2003. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. Vet. Microbiol. 94(3), 257-66.

Niilo L., 1980. *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge. Can. Vet. J. 21(5), 141-148.

Nowell V.J., Poppe C., Parreira V.R., Jiang Y.F., Reid-Smith R. et Prescott J.F., 2010. *Clostridium perfringens* in retail chicken. Anaerobe. 16, 314-315. Doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.11.004.

O

O'Brien T.F., 2002. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin. Infect. Dis.* vol. 34, supplement 3, S78-S84. Doi: 10.1086/340244.

Opengart K., 2008. Necrotic enteritis. In *Diseases of Poultry* 12th ed. Iowa: Blackwell Publishing. pp. 872-879.

P

Padhye S., Banerjee S., Ahmad A., Mohammad R. et 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.

Parish W.E., 1961. Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*). I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. *J. Comparative. Pathol.* 71, 377.

Petit L., Gibert M. et Popoff M.R., 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends. Microbiol.* 3, 104-110.

Ponce A. G., Fritz R., del Valle C. E., et Roura S. I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on native microbial population of organic Swiss Chard (*Beta vulgaris*, type cicla). *Food Science and Technology.* 36: 579-684.

Q

Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. et Carter, G.R., 1994. *Clostridium* species. In *Clinical veterinary microbiology*. Mosby, Edinburgh, Scotland. pp. 191-208.

R

Raj Kapoor B., Anandan A. et Jayakar B., 2002. Anti-ulcer effect of *Nigella sativa* Linn. against gastric ulcers in rats. *Current Science.* 82: 177-179.

Randhawa M.A., Alenazy, A.K., Alrowaili M.G., et Basha j., 2017. "An active principle of *Nigella sativa* L., thymoquinone, showed significant antimicrobial activity against anaerobic bacteria," *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, vol. 6, no. 1, pp.

97–101.

Rooney S. et Ryan M.F., 2005. Effects of Alpha-hederin and Thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on Human Cancer Cell Lines. *Anticancer Research*, **25**: 2199-2204.

S

Salomi M.J., Nair S.C. et Panikkar K.R., 1991. Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutrition and Cancer*, **16**: 67-72.

Schocken-Iturrino R.P., Vittori J., Beraldo-Massoli M.C., Delphino T.P.C. et

Damasceno P.R., 2009. *Clostridium perfringens* search in water and ration used in the raising of broiler in sheds of São Paulo State – Brazil. *Ciênc. Rural*. 40, 1. Doi: 10.1590/S0103-84782010000100033.

Shane S.M., Koetting D.G. et Harrington K.S., 1984. The occurrence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks. *Avian. Dis.* 28(4):1120-1124.

Sharma P.C., Yelne M.B. et Dennis T.J., 2005. Database on medicinal plants used in Ayurveda. New Delhi; p. 420-440.

Shojadoost B., Vince A.R. et Prescott J.F., 2012. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Vet. Res.* 43, 74. Doi: 10.1186/1297-9716-43-74.43.

Slavic D., Boerlin P., Fabri M., Klotins K.C., Zoethout J.K., Weir P.E., 2011.

Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine and Turkey origin from Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 75(2):89–97.

Smith H.W., 1965. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J. Pathol. Bacteriol.* 90, 495-513.

Sokmen A., Jones B. et Erturk M., 1999. The *in vitro* antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 67, 79-86.

Songer J.G., 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996, 9(2), 216-234.

Songer J.G., 1997. Clostridial diseases of animals. In *The clostridia: molecular biology and pathogenesis*. Academic Press, London, San Diego, CA. pp. 153-182.

7

Timbermont L., De Smet L., Van Nieuwerburgh F., Parreira V.R., Van Driessche K., Haesebrouck F., Ducatelle R., Prescott J.F., Deforce D., Devreese B. et Van Immerseel F., 2014. Perfrin, a novel bacteriocin associated with netB positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. *Vet. Res.* 45, 40. Doi: 10.1186/1297-9716-45-40.

Timbermont L., Haesebrouck F., Ducatelle R. et Van Immerseel F., 2011. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian. Pathol.* 40, 341-347. Doi: 10.1080/03079457.2011.590967.

Timbermont L., Lanckriet A., Gholamiandehkordi A.R., Pasmans F., Martel A., Haesebrouck F., Ducatelle R. et Van Immerseel F., 2009. Origin of *Clostridium perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers. *Comp. Immun. Microbial. Infect. Dis.* 32, 503-512.

Toparslan C., 2012. À propos de *Nigella sativa* L. Thèse d'Etat de Doctorat en Pharmacie. Université de Lorraine.

Tschirdewahn B., Notermans S., Wernars K. et Untermann F., 1991. The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. *Int. J. Food. Microbiol.* 14, 175-178.

U

Uzal F.A., Freedman J.C., Shrestha A., Theoret R., Garcia J., Awad M.M., Adam S.V., Moore R.J., Rood J. et McClane B., 2014. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future. Microbiol.* 9, 361-377.

U

Van der Sluis W., 2000. Clostridial enteritis is an often underestimated problem. *World. Poult.* 16, 42-43.

Van Immerseel F., De Buck J., Pasmans F., Huyghebaert G., Haesebrouck F. et Ducatelle R., 2004. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian. Pathol.* 33, 537-549.

Van Immerseel F., Rood J.I., Moore R.J. et Titball R.W., 2009. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends. Microbiol.* 17, 32-36. Doi: 10.1016/j.tim.2008.09.005.

20

Wade B., Keyburn A., 2015. The true cost of necrotic enteritis. *World Poultry.* 31. 16–17.

Warrier P.K., Nambiar V.P.K. et Ramankutty. 2004. Indian medicinal plants-a compendium of 500 species. Chennai: Orient Longman Pvt Ltd. p. 139-142.

Welch W.H. et Flexner S., 1896. Observations concerning *Bacillus aerogenes capsulatus*. *J. Exp. Med.* 1, 4505-4510.

Wells C.L. et Wilkins T.D., 1996. Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli. In *Medical Microbiology* 4th ed. Galveston (TX).

Williams R.B., 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian. Pathol.* 34(3), 159-80. Doi: 10.1080/03079450500112195.

21

Yarnell E. et Abascal K., 2011. *Nigella sativa*: holy herb of the middle East. *Altern Compl Therap.* 17(2): 99-105.

22

Zeissler J. et Rassfeld-Sternberg L., 1949. Enteritis necroticans due to *Clostridium welchii* type F. *Brit. Med. J.* 1(4597), 267–269.

ANNEXE

Annexe : Appareillage de laboratoire



Autoclave Incubateur



Jar d'anaérobiose

Microscope



Bain marie

