



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie appliquée



MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie et Biologie Moléculaire

Thème

Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des plantes médicinales : cas de *Peganum harmala*

Présenté par

ABIDI Khedidja

NAHAL Ghazala

Devant le jury

Dr. ZEGHIB Assia	MCB	Université de Tébessa	Président
Dr. DJABRI Belgacem	MCA	Université de Tébessa	Promoteur
Dr. HAMMOUM Zakia	MAA	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance: 30/05/2016

Abstract

This work is shiner under recovery of medicinal plants of the Algerian steppe flora for that you we are interested in studying a species endemic to Algerian steppe, which in this case is *Peganum harmala*. The present study aimed to evaluate the antioxidant activity of different extracts from *Peganum harmala*. To achieve this objective, various steps have been followed:

Extraction of the major constituents of *Peganum harmala* was made by the use of organic solvents of increasing polarity. A qualitative photochemical characterization was made by the use of different specific caracérisation reactif. The polyphénols content of different extracts was also performed. The study of antioxydante activity was evaluated using DPPH radical by two approaches: a qualitative reading by chromatography on thin layer plate and another quantitative by UV-visible spectrophotometry. Evaluation of the antibacterial activity was done by the middle diffusion method on agar *Pseudomonas aeruginosa*. A comparison of antimicrobial susceptibility testing was also done.

The results show the richness of *Peganum harmala* secondary metabolites whose alkaloids are the most important. The quantitative estimation of total polyphénols by the Folin-Ciocalteu showed that the four extracted from *Peganum harmala* have outstanding tenure polyphénols which methanolic extract is the richest fraction of phenolics compounds with a content of (94 , 03%). The evaluation of the antioxidant activity by DPPH test, revealed only antioxidant power to the methanolic extracts (41.20%) and ethereal (17.15%).

All extracts have proven antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* with enhanced activity was reported in the methanol extracts.

This study emphasizes the special importance of *Peganum harmala* in traditional medicine.

Keys words: *Peganum harmala*, DPPH, antioxidant activity, antibacterial activity, CCM, total polyphénols.

Résumé

Ce travail est mené dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la flore steppique algérienne. Pour cela vous nous sommes intéressées à l'étude d'une espèce endémique de steppe algérienne qui est en l'occurrence *Peganum harmala*. La présente étude visait à évaluer l'activité antioxydante des différents extraits de *Peganum harmala*. Pour atteindre ces objectifs, différentes étapes ont été suivies : L'extraction des constituants majeurs de *Peganum harmala* a été faite par l'utilisation des solvants organiques de polarités croissantes. Une caractérisation phytochimique qualitative a été faite par l'utilisation de différents réactifs spécifiques de caractérisation. La teneur en polyphénols des différents extraits a été également réalisée. L'étude de l'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le radical DPPH par deux approches : une qualitative par lecture sur la plaque chromatographie sur couche mince et une autre quantitative par spectrophotométrie UV-Visible. L'évaluation de l'activité antibactérienne a été faite par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur *Pseudomonas aeruginosa*. Un antibiogramme de comparaison a été également fait.

Les résultats montrent la richesse de *Peganum harmala* en métabolites secondaires dont les alcaloïdes sont les plus importantes. L'estimation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu, a montré que les quatre extraits de *Peganum harmala* possèdent une teneur remarquable de polyphénols dont l'extrait méthanolique est la fraction la plus riche en composés phénoliques avec une teneur de (94,03%). L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH, a révélé un pouvoir antioxydant seules aux extraits méthanolique (41.20%) et étheré (17.15%). Tous les extraits sont révélés une activité antibactérienne contre *la Pseudomonas aeruginosa* avec une meilleure activité qui a été signalé dans l'extrait méthanolique.

La présente étude souligne l'importance particulière de *Peganum harmala* dans la médecine traditionnelle.

Mots clés : *Peganum harmala*, DPPH, activité antioxydante, activité antibactérienne, CCM, polyphénols totaux.

Dédicace

Je remercie Dieu le tout puissant qui m'a aidé à réaliser ce travail.

Je dédie cette thèse

Aux êtres les plus chers : Mes parents,

A ma mère,

Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie.

A mon père,

Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils.

Mes étoiles qui éclairent ma venir mes soeur : Sousou, Aya, Marwa, Assia, Sabrina, Lenda, Salma, Zaara .A

mes très chers frères : Imed, Bader el tamem, rabeH, Nor elddine, Abed el aziz et leurs femmes merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

A mes adorables nièces et neveux ces petits anges qui nous comblent de joie.

A Ma chère binome en mémoire Ghazala pour leur conseils précieuses et belle compréhension .

A mes camarades de la promotion de biologie ,aussi à mes proches amies : Fatiha, Imane, Ghazala, Dalila.

KHEDIDJA

DEDICACES

*Grace à **Dieu** voilà notre travail est terminé et il est temps pour moi de partager ma joie
avec tous ceux qui m'ont encouragé.*

*À travers ce modeste mémoire, je tiens à présenter mes sincères dédicaces à **mes Parents**
les deux personnes les plus chers au monde pour toute leur qui ont consacré leur tendresse, les
sacrifices à mon éducation et ma formation. « Merci, cette memoire est la vôtre ».*

*Mes chers frères **SABER, RIDHA, BRAHIM.***

*Mes chères sœurs **LINDA, NESRINE. IBTISSEM, SOUMAIA***

*A mes adorables neveu et nièces : **DOUAA, AHMED ELAMIN, ISRAA, DJOURI, SHAHED**
ALAUYOUNE, ces petits anges qui nous comblent de joie.*

*A ma grande famille **NAHAL.***

*Ames chers amies **IMAN, KHOULOUUD, HAYET, ACHWAK, SIHAM.***

A toutes les étudiantes de biochimie

*A la fin à ma chère amie, et binôme **KHEDIDJA** a qui je lui souhaite une heureuse vie pleine de
Réussite*



GHAZALA

Remerciements

*Au terme de ce travail, nous remercions Dieu «le Tout Puissant » pour nous avoir donné de la force pour effectuer ce travail. Nous remercions respectueusement notre promoteur, **Dr. DJABRI Belgacem**, d'avoir accepté de diriger ce travail. Nous le remercions aussi pour sa gentillesse, sa spontanéité, ses remarques et suggestions.*

*Nos respects et notre gratitude vont également au **Dr. ZEGHIB Assia** qui a suivi ce travail depuis les premiers instants. Sa pédagogie, son écoute, son ouverture d'esprit et sa vision de la recherche scientifique, nous ont beaucoup marqués .Un grand merci d'avoir accepté de présider notre jury*

*Nous remercions vivement **Dr. HAMMOUM Zakia** qui nous a fait l'honneur de juger ce travail.*

*Nous remercions **Mme FENGHOUR Hind** et **Mr MENASRIA Taha** pour leurs aides et leurs remarques.*

Nous n'oublions pas de remercier vivement les membres de l'équipe des laboratoires de la biologie appliquée, pour leur aides et soutien moral.

*Nous adressons nos vifs remerciements à tout le personnel de laboratoire de recherche de Chimie Organique, spécialement, le **Pr. GOUASMIA***

Abdelkrim.

Nous remercions également toute l'équipe de master biochimie et biologie moléculaire nos enseignants, agents de bibliothèque, ingénieurs de laboratoire.

Nous remercions toute personne ayant contribué, de près ou de loin ,à la réalisation de ce travail.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°	Titre	Page
1	Description de quelques tests antioxydants in vitro chimiques	8
2	Principales classes de composés phénoliques	12
3	Classification de <i>Peganum harmala</i>	16
4	Composition chimique des graines de <i>Peganum harmala</i>	19
5	Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction	22
6	Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour le screening phytochimique	23
7	Liste d'appareils utilisés pour le dosage de polyphénols totaux	27
8	Liste d'appareils utilisés pour l'activité antioxydante	29
9	Liste d'appareils utilisés pour l'activité antibactérienne	32
10	Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition	35
11	Résultats des rendements par rapport à 25g de matière sèche, aspects et couleurs des extraits de <i>Peganum harmala</i> .	36
12	Composés chimiques identifiées dans <i>Peganum harmala</i>	37
13	Teneur des polyphénols totaux (en µg EAG/mg d'extrait) de <i>Peganum harmala</i> .	39
14	L'activité antiradicalaire contre le DPPH des extraits méthanolique et étheré de <i>Peganum harmala</i>	41
15	Détermination du diamètre de la zone d'inhibition (mm) de quatre extraits de <i>Peganum Harmala</i>	43
16	Antibiogramme des bactéries sensibles aux extraits d'étude, étudiées en présence des différents antibiotiques	46

LISTE DES FIGURES

Figure N°	Titre	Page
1	Equilibre entre les oxydants et les antioxydants (état physiologique)	7
2	Arbuste de <i>Peganum harmala</i>	15
3	Différentes parties de <i>Peganum harmala</i> L	16
4	Arbuste de <i>Peganum harmala</i>	20
5	Carte géographique de la station de prélèvement de <i>Peganum Harmala</i> .(Google Map).	20
6	Schéma de conservation de plante d'étude.	21
7	Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive	30
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> au microscope électronique à balayage	33
9	Droite d'étalonnage de l'acide gallique	38
10	Résultat de plaque CCM-DPPH des quatres extraits de <i>Peganum harmala</i> (concentration aléatoire de solution mère d'extrait)	40
11	Résultat de plaque CCM-DPPH des quatres extraits de <i>Peganum harmala</i> (250 µL de solution mère d'extrait (1mg/ml)	41
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 au microscope optique (x100)	42
13	Effet inhibiteur des quatres extraits de <i>Peganum Harmala</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (24 h à 37 ⁰).	44
14	Effet inhibiteur des antibiotiques sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	45

Liste des abréviations et symboles

A: Absorbance.
Ab : Absorbance.
AC : Absorbance du contrôle.
ADN : Acide Désoxyribonucléique.
AE : acétate d'éthyle
AMI : Amikacine.
AMP : Ampicilline.
ATCC: American type culture collection.
ATM: Aztreonam.
ATP: Adénosine triphosphate.
BN : Bouillon nutritif.
C : Concentration.
CAZ : Ceftazidime.
CCM : Chromatographie sur Couche Mince.
CH₃COOH : acide acétique
CS : Colistine
CTX : Cefaxime.
DDL : Degré De Liberté.
DM : déchlorométhane
DPPH : 2, 2-diphényl-1- picrylhydrazyl.
E : Extrait.
EP : éther de pétrol
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.
Fe²⁺ : Fer ferreux.
Fe³⁺: Fer ferrique.
FeCl₃: chlorure ferrique
FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.
GNT: Gentamycine.
GPX: glutathion peroxydase
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.
H₂SO₄: Acide Sulfurique
H₃PMo₁₂O₄: Acide phosphomolybdique
H₃PW₁₂O₄₀: Acide phosphotungestique
HCL: Acide hydrochlorique
HM : hauteur de la mousse
MeOH: Methanol.

MH: Mueller-Hinton.

Molybdène : Mo_8O_3

N₂ : azote

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

NADPH : Forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

NaOH: hydroxide de sodium

NH₄OH: Ammoniac

NO•: Oxyde nitrique.

NOS: NO synthase.

O₂- : Radical superoxyde.

OH•: Radical hydroxyl.

ONOO - : Peroxynitrite.

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity.

PH : Potentiel d'hydrogène.

Pr: Probabilité

R₂ : Coefficient de corrélation.

Rdt : rendement

ROO•: Radical peroxyde.

SD: Ecart type.

SOD : superoxydes dismutases

TEAC : Trolox Equivalent Antioxydant Capacity

TRAP: Total Radical Trapping Antioxidant Potential.

UNUP : United nations university press

UV : Ultra Violet

W₈O₂₃ : tungstène

µg EAG/mg d'extrait : Microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait.

λ_{max} : Longueur d'onde maximale.

Abstract لمصّد

Résumé

Dédicace

Remerciements

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations et symboles

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

01

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Activités biologiques

I. Activité antioxydante	03
I.1. Radicaux libres	03
I.2. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	03
I.3. Stress oxydatif	04
I.4. Antioxydants	04
I.4.1. Définition	04
I.4.2. Mécanisme d'action	05
I.4.3. Substances antioxydantes	05
I.4.3.1. Antioxydants endogènes	05
I.4.3.1.1. Antioxydants enzymatiques	05
I.4.3.1.2. Antioxydants non enzymatiques	06
I.4.3.2. Antioxydants exogènes	06
I.5. Test antioxydant	07
II. Activité antibactérienne	08
II.2. Définition de l'activité antibactérienne	09
II.3. Agents antimicrobiens	09
II.3.1. Agents chimique	09
II.3.2. Les agents physiques	09

II.3.3. Agents chimiothérapeutiques	09
III.4. Les antibiotiques	10
III.4.1. Définition	10
III.4.2. Les antibiotiques naturels et synthétiques	10
III.4.3. Mode d'action des antibiotiques	10

Chapitre II : Composés phénoliques

I. Composés phénoliques	11
I.1. Définition	11
I.2. Structures générales	11
I.3. Classification des polyphénols	12
I.3.1. Non flavonoïdes	12
I.3.2. Flavonoïdes	12
I.4. Polyphénols dans les plantes	12
I.4.1. Localisation	12
I.4.2. Intérêt des polyphénols pour la plante	13
I.5. Propriété anti-oxydantes des polyphénols	13
I.6. Propriétés antibactériennes	14

Chapitre III : *Peganum harmala*

I. <i>Peganum harmala</i>	15
I.1. Description	15
I.2. Noms vernaculaires	16
I.3. Classification	16
I.4. Famille des zygophyllacées	17
I.5. Répartition géographique	17
I.6. Utilisation traditionnelle de la plante	17
I.7. Activités biologiques et pharmacologiques de <i>Peganum harmala</i>	18

I.7.1. Activités pharmacologiques	18
I.7.2. Usage thérapeutique	18
I.8. Composition chimique	18

MATERIELS ET METHODES

I. Macération et extraction	20
I.1. Matériels	20
I.1.1. Matériel végétal	20
I.1.2. Conservation de matériel végétal	21
I.1.3. Matériels utilisés	22
I.2. Méthode	22
I.2.1. Préparation des extraits	22
I.2.2. Calcul du rendement des extractions	23
II. Screening phytochimique	23
II.1. Matériel	23
II.2. Méthode	24
II.2.1. Tests phytochimiques	24
II.2.1.1. Recherche des alcaloïdes	24
II.2.1.2. Recherche des Terpènes et des Stérols	24
II.2.1.3. Recherche des anthocyanes	24
II.2.1.4. Recherche des tannins	26
II.2.1.5. Recherche des saponines	26
II.2.1.6. Recherche des quinones	26
II.2.1.7. Recherche des flavonoïdes	26
II.2.1.8. Recherche des Leucoantocyanes	26
III. Détermination du taux des composés phénoliques totaux	27
III.1. Matériel destiné à la réalisation du dosage de polyphénols totaux	27

III.2. Méthode	27
III.2.1. Principe	27
III.2.2. Mode opératoire	28
III.2.3. Méthode de calcul	28
III.2.4. Analyse statistique des données	28
IV. Tests d'activités biologiques	28
IV.1. Détermination de l'activité antioxydante (Test d'activité anti DPPH)	28
IV.1.1. Matériel destiné à la réalisation de l'activité anti oxydante	28
IV.1.2. Méthodes	29
IV.1.2.1. Principe	29
IV.1.2.2. Screening par DPPH-CCM: (Chromatographie sur couche mince)	30
IV.1.2.2.1. Principe	30
IV.1.2.2.2. Mode opératoire	30
IV.2.3. Test antiradicalaire contre le DPPH mesuré au spectrophotomètre	31
IV.2.3.1. Principe	31
IV.2.3.2. Mode opératoire	31
IV.2.3.3. Méthode de calcul	31
IV.2.3.4. Analyses statistiques des données	31
IV.2. Détermination de l'activité antibactérienne (diffusion en milieu gélosé)	31
IV.2.1. Matériel destiné à la réalisation de l'activité antibactérienne	31
IV.2.2. Méthode	32
IV.2.2.1. Principe	32
IV.2.2.2. Bactérie d'étude	32
IV.2.2.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
IV.2.2.3. Mode opératoire	33
IV.2.2.3.1. Préparation et fixation du frottis bactérien	33
IV.2.2.3.2. Coloration de Gram	33
IV.2.2.3.3. Préparation de l'inoculum	33

IV.2.2.3.3.1. Enrichissement	33
IV.2.2.3.3.2. Préparation de la suspension bactérienne	33
IV.2.2.3.3.3. Ensemencement / Test antibactérien	33
IV.2.2.3.3.4. Lecture	34
IV.2.3. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme	35
IV.2.3.1. Principe	35
IV.2.3.2. Mode opératoire	35

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Extraction	36
II. Les tests phytochimiques	37
III. Dosage des polyphénols totaux	38
III.1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	38
III.2. Teneur des extraits en polyphénols	38
IV. Etude de l'activité antioxydante	40
IV.1. Tests par CCM (Chromatographie sur couche mince)	40
IV.2. L'activité antiradicalaire contre le DPPH	41
V. Etude de l'activité antibactérienne	42
V.1. La coloration de Gram	42
V.2. Test de sensibilité aux extraits d'étude	43
V.3. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme	45

CONCLUSION **47**

BIBLIOGRAPHIE **48**

ANNEXES **60**



Chapitre I

Activités biologiques





Chapitre II

Composés phénoliques





Chapitre III

Peganum harmala





SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE





MATERIELS ET METHODES





Partie expérimentale





RESULTATS ET DISCUSSION





CONCLUSION ET PERSPECTIVES





REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE





Annexes



Introduction

La médecine traditionnelle est l'ensemble des connaissances et pratiques explicables ou non, utilisées pour diagnostiquer, prévenir ou éliminer un déséquilibre, physique, mental, ou social en se fondant, exclusivement, sur des connaissances acquises ou transmises de génération en génération, oralement ou par écrit (**OMS, 2002**). La médecine traditionnelle est basée essentiellement sur l'utilisation des plantes médicinales, qui représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs. En effet, d'après les estimations, la médecine traditionnelle assume entre 80% et 90% des soins de santé en Afrique (**OMS, 2002**).

A l'heure actuelle, les scientifiques mettent en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO). Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le vieillissement et le cancer et indirecte sur la peroxydation des lipides des denrées alimentaires. Récemment, une recrudescence d'intérêt est à remarquer concernant les effets biologiques des antioxydants naturels, inclus dans la lutte contre le stress oxydatif, pouvant constituer une solution alternative aux produits chimiques. Parmi ces substances naturelles, les polyphénols peuvent constituer un bon choix de composés bioactifs qui agissent contre les espèces réactives de l'oxygène (**REZZAGUI, 2012**).

L'évolution rapide des bactéries pathogènes vers la multi résistance aux antibiotiques est une des motivations essentielles à la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes. De nombreux travaux antérieurs étaient focalisés sur la mise en évidence de pouvoir antimicrobien des extraits des plantes médicinales notamment celui des polyphénols (**Daroui, 2012**) dont l'efficacité contre les micro-organismes pathogènes ont été démontrés.

Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal Algérien, se trouve le genre *Peganum* qui appartient à la famille des *zygophyllacées*. Ce genre est largement distribué, surtout dans les zones arides et sèches méditerranéennes, sur les sols sableux et légèrement nitrés (**Iserin, 2001**). L'harmel est parmi les espèces qui appartiennent au genre *Peganum*. Cette plante est très utilisée en médecine traditionnelle Algérienne et maghrébine pour traiter différents troubles comme narcotiques, antispasmodiques, contre l'asthme.... (**Hammiche et Merad, 1997**). Plusieurs effets biologiques ont été rapportés pour le genre *Peganum* : antinflammatoire, analgésique, antitumorale, vasodilatatrice, antispasmodique, antidépressive, et surtout des effets antioxydants et antimicrobiens.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude dont l'objectif principal est de rechercher une éventuelle activité antioxydante et antibactérienne des différents extraits de la partie aérienne de *Peganum harmala*, en passant par l'extraction et l'étude phytochimique des différents extraits de *Peganum harmala*. Pour répondre à ces objectifs, deux parties seront présentées :

- La première partie sera consacrée à une revue bibliographique où nous apportons des données générales subdivisées en trois chapitres. Les activités antioxydante et antibactérienne des plantes médicinales ont été présentées dans le premier chapitre, le deuxième chapitre a été consacré aux composés phénoliques, le troisième chapitre présente la plante d'étude.
- Une seconde partie est expérimentale dans laquelle seront illustrés les méthodes utilisées, les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

I. Activité antioxydante

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (Traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant qui est dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène (**Walker et al., 1982**).

I.1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, une molécule, un morceau de molécule ou même un simple atome, capable d'avoir une existence indépendante « libre » en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale) (**Goudable et al., 1997**). Un radical libre est le plus souvent instable ayant une durée de vie très courte (de l'ordre d'une micro à une nanoseconde) (**benaisa, 2012**). Il est donc réactif du fait de son instabilité chimique avec une tendance à revenir vers un état plus stable en donnant un électron ou en prenant un autre. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour des radicaux libres et initient ainsi une chaîne de réaction (**Lev et al., 2007**).

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de composés appelés **radicaux primaires** qui jouent un rôle particulier dans la physiologie, à savoir l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), le radical peroxyde (ROO^{\cdot}) et le radical alkoxyde (RO^{\cdot}). Les autres radicaux libres, dits **radicaux secondaires** telles que l'oxygène singulier O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier, 2003**).

I.2. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron (**Jacques et André., 2004 ; Gutteridge, 1993**). Les ERO peuvent apparaître ou se former suite à des facteurs exogènes ou endogènes (**Wu et Cederbaum., 2003**). Dans les conditions physiologiques, les ERO sont produites en permanence dans l'organisme et à des faibles concentrations. Ils ont des rôles physiologiques très importants au sein des cellules en agissant sur le fonctionnement de certaines enzymes, la transduction de signaux cellulaires, la

défense immunitaire, la destruction par apoptose des cellules tumorales, la régulation de la dilatation capillaire et la régulation des gènes (Favier, 2003). Cependant, la rupture de l'équilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production des ERO entraîne des lésions biochimiques au niveau cellulaire. Les systèmes de lutte contre les ERO sont classés en 3 catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (Viot, 2004) .

I.3. Stress oxydatif

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, est défini comme étant un déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs qui en résultent (Boyd *et al.*, 2003). Il est impliqué dans diverses pathologies telles que la maladie de Parkinson (Bolton *et al.*, 2000), les maladies cardiovasculaires (Jha *et al.*, 1995), les cancers (Ali *et al.*, 2008), le diabète, les maladies d'Alzheimer (Smith *et al.*, 2004,) et le processus de vieillissement (Aruoma, 2003 ; Georgetti *et al.*, 2003). Un état de stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes se présente (Lausanne, 2010).

- Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes)
- Excès des ERO, de N_2 ou de Cl_2
- Mécanismes de réparation insuffisants

Evaluer le stress oxydant chez un individu consiste donc à estimer la production d'oxydants, à évaluer les mécanismes de défense et à analyser les produits secondaires qui peuvent en résulter (Morena *et al.*, 2002).

I.4. Antioxydants

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme (Shahidi, 1997).

I.4.1. Définition

Un antioxydant est défini comme étant une substance chimique qui présente, à des faibles concentrations par rapport à un substrat oxydant, la capacité de ralentir ou inhiber l'oxydation de ce dernier (Helliwell *et al.*, 1992 ; Gutteridge, 1993 ; Pokorny *et al.*, 2001 ; Magalha *et al.*, 2008), et le transformer en un composé plus stable. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des

maladies inflammatoires et cardiovasculaires (Vârban *et al.*, 2009). Ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Suhaj, 2006).

La structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les radicaux libres (Cristina, 2009). Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. (Rice-Evans *et al.*, 1995; Bartosz, 2003).

I.4.2. Mécanisme d'action

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol.

En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables. Du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées, ils vont attaquer par l'oxygène moléculaire. Les antioxydants sont en fait des agents de prévention. Ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres. Ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, ils réagissent rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulier pour la transformer en chaleur (Hellal, 2011).

I.4.3. Substances antioxydantes

Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation ou la médication, et sont donc exogènes (Benaïssa, 2012).

I.4.3.1. Antioxydants endogènes

I.4.3.1.1. Antioxydants enzymatiques

Pour faire face aux attaques oxydatives, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui visent :

- A éliminer les ERO et les catalyseurs de leur formation.
- A induire la synthèse des antioxydants.
- A augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées. Trois types d'enzymes antioxydantes sont mis en œuvre pour la destruction des ERO (Pelletier *et al.*, 2004).

- ✓ Les superoxydes dismutases (SOD) qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (**Droillard *et al.*, 1990 ; Arisi *et al.*, 1998**).
- ✓ La catalase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau permettant l'élimination de celui-ci (**Yoshimoto *et al.*, 2007 ; Nicholls, 2012**).
- ✓ La glutathion peroxydase (GPX) qui décompose aussi le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion comme donneur d'hydrogène (**Bédane, 2008**).

I.4.3.1.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ce type d'antioxydants possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au cœur des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques. Ce type d'antioxydants regroupe un grand nombre de substances, On peut citer parmi les plus actifs :

- Le glutathion (**Piquet *et al.*, 2007**)
- NADPH, les dipeptides (**Boldyrev, 1993**)
- L'acide urique (**Ames *et al.*, 1993**)
- L'acide lipoïque(**Pham-Huy *et al.*, 2008**).
- La bilirubine (**Stocker *et al.*, 1987**).

Le taux de ce système de défense dans l'organisme est essentiellement assuré par un apport alimentaire. Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

- Acide ascorbique (vitamine C).
- Tocophérols (dont la vitamine E).
- Caroténoïdes.

I.4.3.2. Antioxydants exogènes

En plus des substances propres à l'organisme, l'alimentation et les plantes sont également d'importantes sources d'antioxydants. L'organisme peut tirer profit de nombreux antioxydants exogènes naturels présents dans son alimentation (**Pham-Huy *et al.*, 2008 ; Kalam *et al.*, 2012**). Bien que non indispensables à la vie, ces substances jouent un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant. Les plus importantes parmi eux sont les vitamines (E et C), les caroténoïdes, les polyphénols, les acides gras (oméga-3 et oméga-6) ainsi que des traces des métaux (sélénium, manganèse, et zinc). Contrairement aux

antioxydants enzymatiques, ces substances ne permettent l'élimination que d'un seul radical libre à la fois. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, ces antioxydants doivent être donc régénérés par d'autres systèmes (Pham-Huy *et al.*, 2008).

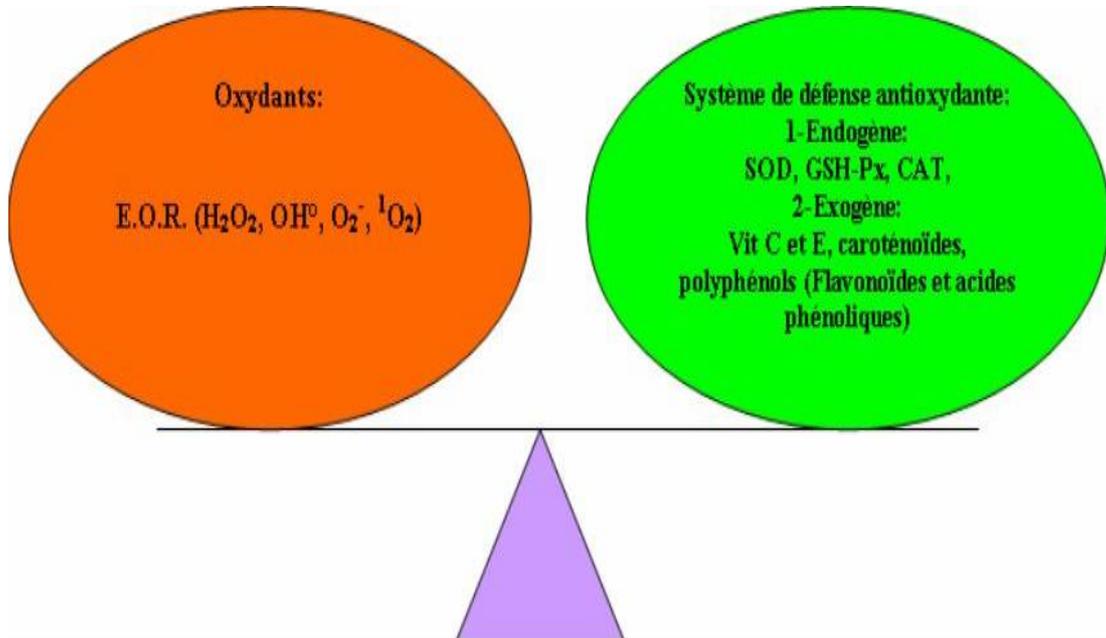


Figure 01 : Equilibre entre les oxydants et les antioxydants (état physiologique) (Prior et Gu, 2005)

I.5. Test antioxydant

Différents tests ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de Plante (**Tableau 01**) . Parmi les tests les plus souvent utilisé nous pouvons citer : le test de DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl), le test du blanchissement de β -carotène et la méthode de la réduction du fer FRAP (Ferricreducingantioxidant power). Le test le plus souvent utilisé pour sa rapidité et sa facilité et celui du DPPH.

Tableau 01 : Description de quelques tests antioxydants in vitro chimiques (Prior *et al.*, 2005).

Tests	DPPH	TEAC	FRAP	ORAC
Mécanismes réactionnels	•transfert d'électron majoritaire	•transfert d'électron et de proton	•transfert d'électron	• transfert de proton
Nature des molécules testées	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles et lipophiles	•hydrophiles	•hydrophiles et lipophiles
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> •très facile à mettre en œuvre • peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> • très facile à mettre en œuvre • cinétique de réaction très rapide • peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> • très facile à mettre en œuvre •peu couteux 	<ul style="list-style-type: none"> •facile à mettre en œuvre •couteux (nécessité d'un fluorimètre) • Utilisation d'un générateur de radicaux (ROO•)
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> • encombrement stérique de molécules à hauts poids moléculaires •interférences possibles à 515 nm •forte dépendance au pH et au solvant •radical inexistant <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • produits de dégradation antioxydants •radical inexistant <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> •pH utilisé non physiologique •interférences possibles à 595 nm 	<ul style="list-style-type: none"> • mécanismes de génération des ROO • non physiologique •interférences possibles des protéines

II. Activité antibactérienne

Généralité

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils dépourvus de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires).

Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria. Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique (Nauciel et Vildé, 2005).

II.2. Définition

L'activité antibiotique correspond à l'activité d'une molécule ou d'un composé présent au sein d'un végétal qui, à très faible concentration, inhibe le développement d'une bactérie ou la tue. La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de l'antibactérien. Face à un antibactérien donné, la sensibilité d'une bactérie peut être très différente selon la souche d'appartenance (**Daniel et Nicolas, 1998**).

II.3. Agents antimicrobiens

On désigne par agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes (**Asada et al., 1998**).

Ces substances ayant une affinité pour les cellules des parasites et le pouvoir de les tuer plus fort que les dommages qu'elles causent à l'organisme; ce qui rendra possible la destruction des parasites sans perturbation sérieuse de l'organisme (**Perry et al., 2002**).

La destruction ou l'arrêt de la prolifération des micro-organismes venant de l'environnement, dans l'organisme, et dans les aliments, nécessite l'utilisation d'agents antimicrobiens. On distingue 3 catégories d'agents antimicrobiens

II.3.1. Les agents chimiques

Ils correspondent aux substances utilisées comme désinfectants et antiseptiques. Les désinfectants sont des agents antimicrobiens utilisés sur les matériaux inertes ; leur action est létale ou inhibitrice de la croissance microbienne. Les antiseptiques ont la même nature chimique que les désinfectants mais leur toxicité plus réduite permet leur emploi sur les tissus vivants (**Bousseboua, 2001**).

II.3.2. Les agents physiques

De nombreux agents physiques exercent un effet antagoniste vis-à-vis des microorganismes. La chaleur ou certains types de radiations ont une action létale qui permet leur emploi dans la stérilisation de différents milieux. (**Brigitte, 2006**)

II.3.3. Agents chimiothérapeutiques

Un agent chimiothérapeutique est un composé chimique ou de synthèse qui inhibe le développement des microorganismes. Ce composé agit à faibles doses, il exerce une action très spécifique sur le fonctionnement cellulaire tout en ayant une toxicité sélective. Il inhibe le développement de sa cible ou la tue tout en étant inoffensif pour l'hôte. Dans ce groupe, on retrouve les antibiotiques, les antifongiques et les antiviraux (**Guillaume, 2000**).

III.4. Les antibiotiques

III.4.1. Définition

Du grec anti, "contre" et bios, " la vie" les antibiotiques sont des composés chimiques ayant la propriété de tuer ou d'empêcher la prolifération des micro-organismes pathogènes.

Ce sont des substances produites naturellement par certaines moisissures et bactéries (Brigitte, 2006).

III.4.2. Les antibiotiques naturels et synthétiques

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (Newman *et al.*, 2003 ; Singh et Barrett., 2006). Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de microorganismes.

Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes (Guinoiseau, 2010).

III.4.3. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent habituellement soit comme bactéricides (ils tuent les bactéries) soit comme bactériostatiques (ils inhibent la croissance bactérienne et détruisent les bactéries) (Chetley, 2000).

Les principaux mécanismes d'action des antibiotiques incluent (Jerome *et al.*, 2004) :

- Le blocage de la synthèse de la paroi cellulaire.
- La destruction des membranes cellulaires.
- L'interférence avec divers aspects de la synthèse des protéines et des acides nucléiques.

I. Composés phénoliques

Avec plus de 8000 structures phénoliques connues, les composés phénoliques constituent l'une des grandes familles de molécules largement répandues dans le règne végétal (**Beta et al., 2005**). Ils regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupements hydroxyles. Les vertus thérapeutiques de ces composés sont bien connues. En effet, la protection par exemple contre plusieurs maladies (cancers, maladie d'Alzheimer, troubles cardiovasculaires, ...) est due à leurs propriétés antioxydants (**Fleuriot et al., 2005**).

I.1. Définition

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Plus de 8000 structures ont été identifiées (**Waksmundzka et al., 2011**) allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (**Daiet al., 2010**). Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (**Visioli et al., 2000**). La nature et la fonction des composés phénoliques s'accumulant dans les plantes sont variables. Ils présentent des propriétés antimicrobiennes (phytoalexines), anti-oxydantes ou même des fonctions dans la signalisation (acide salicylique).

I.2. Structures générales

Les composés phénoliques sont constitués d'un noyau aromatique comportant une ou plusieurs fonctions hydroxyles ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyl ester, glycoside, etc...). Il en existe quatre grandes classes : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes (**Céline, 2011**).

I.3. Classification des polyphénols

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : les flavonoïdes et les non flavonoïdes (**Tableau 02**) .

I.3.1. Non flavonoïdes

Les principaux composés des non flavonoïdes sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines (**Harbone, 1989 ; Hoffmann, 2003 ; Macheix, 1990**).

I.3.2. Flavonoïdes

Dans le groupe les flavonoïdes, on caractérise principalement les Flavones, les flavanones, les flavonols, les isoflavonones, les anthocyanines et les proanthocyanidines (**Pincemail et al., 2007**).

Tableau 02 : Principales classes de composés phénoliques (**Harbone, 1989 ; Hoffmann, 2003 ; Macheix, 1990**).

Groupe	Squelette carboné	Classe
Non flavonoïdes	C6	Phénols simples
	C6 – C1	Acides hydroxybenzoïques
	C6 – C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines
	C6 – C4	Naphtoquinones
	C6 – C2 – C6	Stilbènes
	(C6 – C3) 2	Lignanes
	(C6 – C3) n	Lignines
	(C15) n	Tanins
Flavonoïdes	C6 – C3 – C6	Isoflavonoïdes Flavonoïdes Flavonols Anthocyanes Flavanones

I.4. Polyphénols dans les plantes

I.4.1. Localisation

A l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont

conjugés, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles, la répartition des composés est variable. Par exemple, les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme (**Bénard, 2009**).

I.4.2. Intérêt des polyphénols pour la plante

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans le métabolisme de la plante mais aussi peuvent réagir dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV...etc). Toutes les catégories de composés phénoliques sont impliquées dans les mécanismes de résistance (**Dicko et al., 2006**). Ils assurent la communication entre cellules, entre végétaux et entre végétaux et animaux (**Robert et al., 2000**).

Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales. C'est la raison pour laquelle 80% des composés phénoliques sont essentiellement localisés dans les tissus épidermiques de la plante. Ils sont associés à de nombreux processus physiologiques tels que la croissance cellulaire, la différenciation, l'organogenèse, la dormance des bourgeons, la floraison, la tubérisation ... (**UNUP, 1986**). Ces composés jouent aussi un rôle important dans la qualité alimentaire des fruits et déterminent aussi leurs saveurs. Les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs alors que les flavones sont responsables de l'amertume des *Citrus* et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des dihydrochalcones à saveur sucrée (**Dryune et al., 1999**).

I.5. Propriété antioxydantes des polyphénols

Les polyphénols sont des composés que l'on trouve dans toutes les plantes (**Djeridane et al., 2006**). Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. En effet, il est connu que les flavonoïdes sont à l'origine de plusieurs effets biologiques tels que l'activité anti-inflammatoire et antitumorale. Ces effets sont attribués en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. Ce principe a été utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments (**Masquelier, 2006**).

I.6. Propriétés antibactériennes

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques, sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire (Cowan, 1999).

I. *Peganum harmala*

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité. Ces plantes font aujourd'hui l'objet d'un regain d'intérêt scientifique et d'une plus large utilisation (Tabuti *et al.*, 2003). Ils sont utilisés depuis l'antiquité pour soulager et guérir les maladies humaines (Boudjouref, 2011).

I.1. Description

Peganum harmala : est une plante herbacée glabre et pluriannuelle qui peut atteindre 70cm d'hauteur. Elle est caractérisée par des tiges très rameuses et des feuilles divisées en étroites lanières. Elle a des fleurs blanches à cinq pétales et à capsules sphérique (Figure 02).

Les fruits sont des petites capsules sphériques déprimées au sommet renfermant des graines noires *Peganum harmala* émet une odeur désagréable quand on la froisse (Bouziane, 2012). Il s'agit d'une espèce qui pousse spontanément.

L'harmel est une espèce abondante dans les pâturages arides, les steppes et dans les montagnes. Elle pousse dans les sols salins des régions semi-désertiques. Malgré sa réputation de plante euphorisante et prétendument aphrodisiaque, l'Harmel reste peu employé par la phytothérapie occidentale moderne car il présente des risques de toxicité (Anonyme, 2007 ; Lamchouri, 2002). Les plantes qui appartenant à cette famille Zygophyllaceae, sont très reconnaissables à l'aspect de ses herbes, arbustes, ou arbres, elles ont des feuilles stipulées, très polymorphes. Les fleurs de 4 à 5 mères, isolées ou inflorescences, la corolle, est également de 4 à 5 mères, et parfois nulle.



Figure 02 : Arbuste de *Peganum harmala* (Faculty.ksu.edu.sa, 2012).

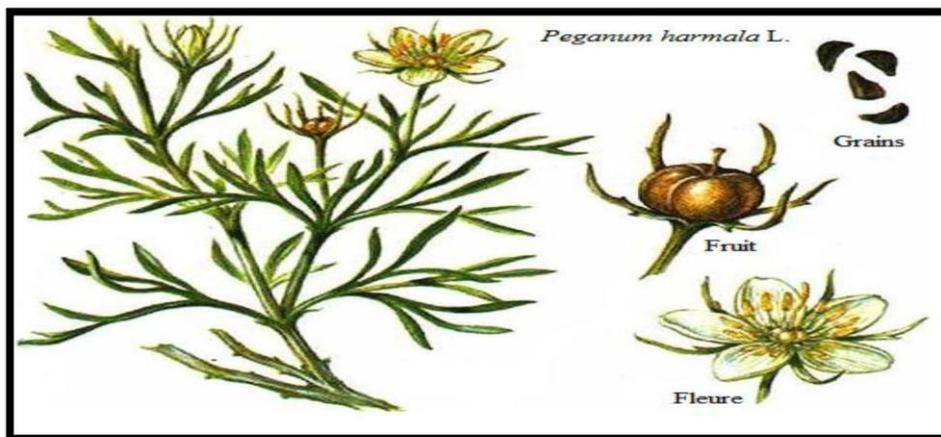


Figure 03 : Différentes parties de *Peganum harmala* L (Healthyhomegardening.com) .

I.2. Noms vernaculaires

Cette espèce a plusieurs noms vernaculaires comme Harmel ou Harmal El sahari en Algérie et en Afrique du Nord, Bender tiffin en Tamachek (Touareg), Rue sauvage ; Rue verte ; Pégane en France, Bizr el harmel en Egypte, African rue ou Syrian rue en Etats Unis et Espand en Iran. Il s'agit d'une espèce qui pousse spontanément dans les régions steppiques et semi-arides (Chopra *et al.*, 1960 ; Ozenda, 1977 ; Quezel et Santa, 1963 ; Yousefi *et al.*, 2009)

I.3. Classification

La Position systématique de *Peganum harmala* est comme suit :

Tableau 03 : La classification de *Peganum harmala* selon (Ozenda, 1991).

Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Sapindales
Famille	Zygophyllaceae
Genre	<i>Peganum</i>
Espèce	<i>Harmala</i>

I.4. Famille des zygophyllacée

Les zygophyllacées, constituent une famille avec environ 285 espèces, qui se subdivisent en cinq sous-familles et 27 genres (**Buppachart et Wanchai, 2002 ; Geiger et Markham, 1994**). Elles sont largement distribuées dans les régions arides, semi-arides, les terrains salés, et les pâturages désertiques Les Zygophylloideae, constituent la sous famille la plus large avec 180 espèces, regroupées en quatre genres : *Augea* (monotypique), *Tetraena* (monotypique), *Fagonia* (30 espèces), et *Zygophyllum* (150 espèces), de coté de quatre autres sous-familles : Larreoideae, Morkillioideae, Seetzenioideae et Tribuloideae (**Buppachart et Wanchai, 2002**) .

I.5. Répartition géographique

Cette plante est largement distribuée à travers le monde. Elle est pousse en Europe australe et austro-orientale, Asie mineure, Tibet, Iran, Turkestan, Syrie, Arabie, Egypte et en Afrique du Nord. En Algérie, *P. harmala*. est commune aux hauts plateaux, au Sahara septentrional et méridional, et aux montagnes du Sahara central. Il est réputé pour les terrains sableux, dans les lits d'oued et à l'intérieur des agglomérations (**Chopra et al., 1960 ; MAIRE, 1933 ; OZENDA, 1991**).

I.6. Utilisation traditionnelle de plante

En médecine traditionnelle dans les pays arabes, les graines de *P. harmala* sont utilisées depuis longtemps comme narcotiques, antispasmodiques, contre l'asthme (**Bellakhdar, 1997 ; Siddiqui, 1988**).

La plante *Peganum harmala* est très utilisée en médecine traditionnelle algérienne et maghrébine pour traiter différents troubles tel que (**Hammiche et Merad, 1997**) :

- Gynécologiques: emménagogue, abortif, stérilité féminine
- Généraux: hypnotique, antipyrétique, antalgique, et antitussif
- Digestifs: coliques, troubles digestifs
- Cutanés: antiseptique, cicatrisant, contre les dermatoses (eczémas), brûlures, conjonctivites purulentes, blépharites, et alopecie.
- Infectieux: tétanos néonatal; anthelminthique (ascaris, ténia).
- autres: sudorifique, dépuratif...etc.

Il est utilisé par les populations locales en fumigation pour dissiper les troubles et traite les convulsions des enfants; en décoction et pommade pour le traitement des fièvres et en frictions pour soigner les rhumatismes (**Bouziane, 2012**).

I.7. Activités biologiques et pharmacologiques de *Peganum harmala*

I.7.1. Activités pharmacologiques

Les graines de *Peganum harmala* ont fait l'objet de nombreux travaux mettant en évidence des activités variées. La majorité d'entre elles sont concernées surtout des effets cytotoxiques, anti-nociceptifs et antimicrobiens (**Rezzagui, 2012**).

I.7.2. Usage thérapeutique

Les extraits de cette plante sont utilisés pour le traitement du diabète et l'hypertension artérielle (**Caccamese et al., 2005**). Ils possèdent une activité antinflammatoire, antioxydante, hypothermique, analgésique, antitumorale, vasodilatatrice, antispasmodiques, abortive, antidépressive, et surtout des effets hallucinogènes (**Berrougui et al., 2006 ; Chen et al., 2005 ; Farouk et al., 2008 ; Farzin et Mansouri, 2005 ; Lamchouri et al., 1999 ; Lamchouri et al., 2006 ; Tse et al., 1991**).

I.8. Composition chimique

Peganum harmala possède des métabolites primaires produits en quantité importante tels que les acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides amines (valine, proline, thréonine, histidine, acide glutamique, l'aniline, N-phénylformamide, et N-acétylaniline phénylalanine) (**Baxter et Harbome, 1999 ; Sharaf et al., 1997 ; Tahrouch et al., 2002**) et carbohydrates. A coté de ces métabolites primaire, *Peganum harmala* produit également plusieurs métabolites secondaires qui, en revanche, sont produites en très faible quantité (**Bruneton, 1993**).

Tableau 04 : Composition chimique des graines de *Peganum harmala* .

Métabolites secondaires	Taux %	Molécules identifiées	Références
Alcaloïdes	5 à 10%	β -carbolines quinazolines	(Kartal <i>et al.</i> , 2003) (Khashimov <i>et al.</i> , 1969) (Zharekeev <i>et al.</i> , 1974)
polyphénols	4.6%	Flavonoïdes, quinones Tanins, coumarines	(El Allagui <i>et al.</i> , 2006) (Baghiani <i>et al.</i> , 2012)
Saponines	ND %	NI	(Farouk <i>et al.</i> , 2009) (El Allagui <i>et al.</i> , 2006)
Huiles fixes	15.86%	Acide linoléique Acide linoléique, palmitique, melissique, β sitostérol, etc. terpènes et stérols	(Kurachko <i>et al.</i> , 1969) (Agedilova <i>et al.</i> , 2006) (Farouk <i>et al.</i> , 2009)
Caroténoïdes	0.7%	α -carotène, σ -carotène β -carotène	(Kurachko <i>et al.</i> , 1969) (Asilbekova, 2006)

ND : non déterminé ; NI : non identifié.

Matériels et méthodes

I. Macération et extraction

I.1. Matériels

I.1.1. Matériel végétal

Peganum harmala (photo 01) a été récoltée, lavée, séchée et conservée par Gattoute Saliha dans la région de Bir dhab (Djbel Belkif) de la wilaya de Tébessa, L'échantillon en Floraison a été prélevé en début du mois de juin de l'année 2015. L'identification de l'espèce de la plante a été déterminé par ; M^{me} Hayoun Soraya, Maitre assistante a département des êtres vivants, Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, Université Larbi Tébessi, TEBESSA.



Figure 04 : Arbuste de *Peganum harmala* (Djbel Belkif, 2015).



Figure 05 : Carte géographique de la station de prélèvement de *Peganum Harmala*.
(Google Map).

I.1.2. Conservation de matériel végétal

Dans le but de conserver notre plante d'étude (**Figure 05**) nous avons nettoyé la partie aérienne de la plante puis nous l'avons séchée afin de la broyer.

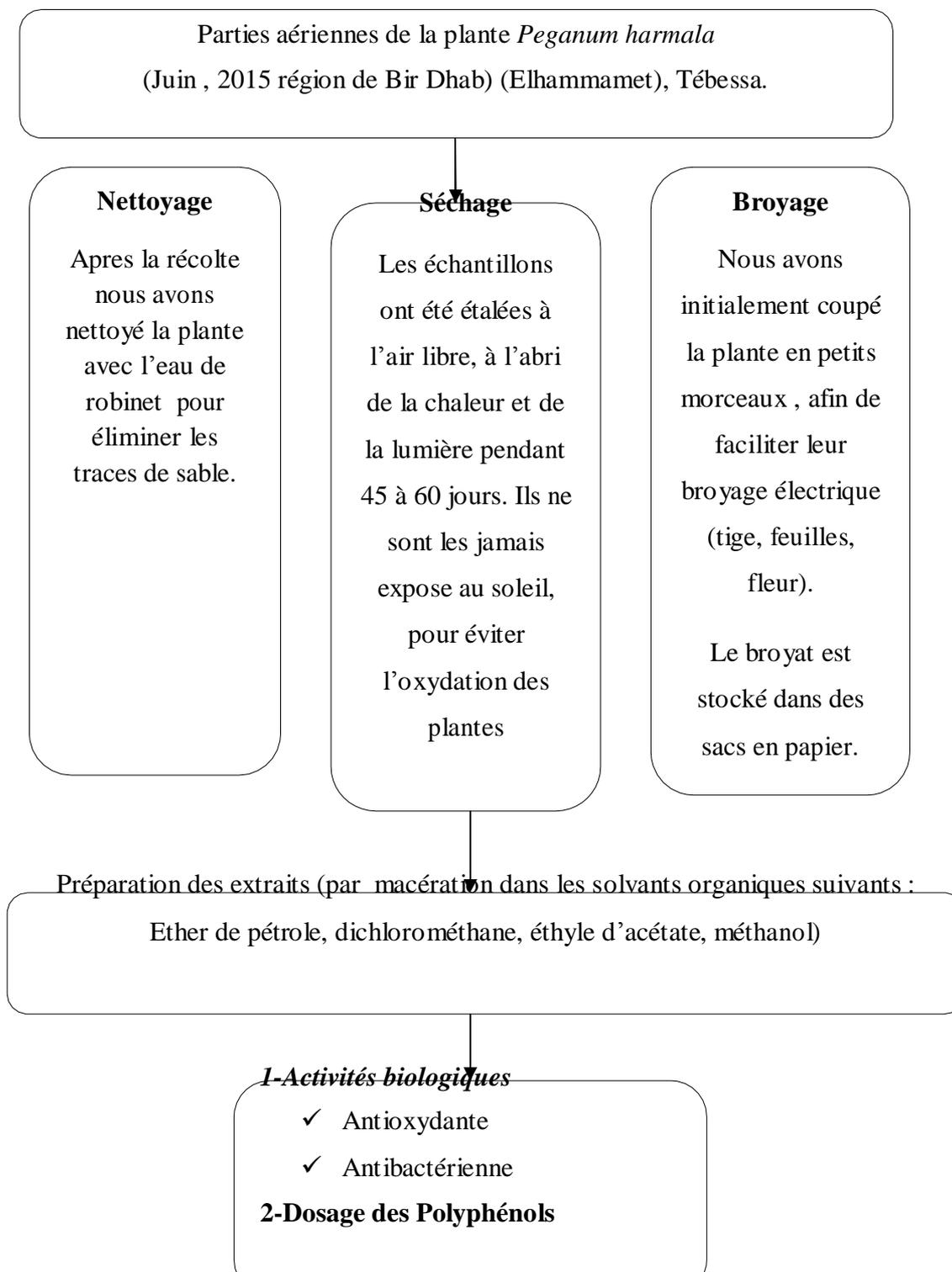


Figure 06 : Schéma de conservation de plante d'étude .

I.1.3. Matériels utilisés

Déférentes matériels ont été utilisés pour la préparation des extraites de *Peganum harmala* :

Tableau 05 : Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction.

Appareils	Verrerie et autres	Réactifs et autres
Rota vapeur (BUCHI R 210)	Pipette en verre	Eau distillée
Balance de précision (ALS 286 4N)	Béchers	Ethanol, méthanol
Etuve (Mettler)	Eprouvettes graduées,	Ether de pétrol
Balance (DHAUS Scout SE)	Entonnoirs, Pissettes.	Éthyle d'acétate
	Flacons en verre.	Déchlorométhane
	Ecouvillons, Coton, Papier filtre	
	Papier (aluminium, absorbant)	

I.2. Méthodes

Les extraits bruts ont été obtenus par extractions successives, avec des solvants organiques de polarités croissantes. Dans cet ordre, nous avons utilisé l'éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyl et le méthanol. Cette étape permet de séparer les polyphénols selon leur structure et leur degré de polymérisation, en les affrontant avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire :

- **L'affrontement avec l'éther du pétrole** : permet d'extraire les impuretés (composés non phénoliques) surtout les lipides (AKROUM, 2006).
- **L'affrontement avec le dichlorométhane** : permet d'extraire des aglycones apolaires (méthoxylés, et peu hydroxylés) (AYAD, 2008).
- **L'affrontement avec l'acétate d'éthyle** : entraîne les aglycones, les mono-O glycosides, et les flavonoïdes (AKROUM, 2006).
- **L'affrontement avec le méthanol** : permet d'extraire les flavonoïdes, alcaloïdes, tannins (El Allagui et al., 2007)

I.2.1. Préparation des extraits

Le protocole d'extraction adopté, a été élaboré dans le laboratoire de recherche des molécules bioactives et applications par **Dr Zeghib A.**

Dans ce protocole nous avons étulisé des solvants organiques par une polarité croissante tel que : l'éther de pétrole, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol.

I.2.2. Calcul du rendement des extractions

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec par le rapport entre le poids de l'extrait sec, avec le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme. Les rendements des extractions sont calculés suivant la formule ci-dessous:

$$Rdt(\%) = \frac{M_{\text{extrait}}}{M_{\text{échantillon}}} * 100$$

Avec : M_{extrait} = masse de l'extrait en gramme.

$M_{\text{échantillon}}$ = masse de l'échantillon (végétal) en gramme.

II. Screening phytochimique

II.1. Matériel

Déférentes matériels ont été utilisés pour réaliser une étude phytochimique sur notre plante :

Tableau 06 : Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour le screening phytochimique.

Appareil	Verrerie et autres	Réactifs et autres	Solvants et solutés
Balance (DHAUS Scout SE)	Tubes à vis 16x160mm, Béchers	Réactif de Mayer	Ethanol
Bain-marie agitatif (GFL 1083)	Entonnoir	Acide chlorhydrique HCl	Méthanol
Plaque chauffante agitative (IKA RH basic 2)	Fioles, Verre à montre, Pipette en verre	Acide acétique C ₂ H ₄ O ₂ , Coupeaux de magnésium	Chloroforme
Bain de sable (WITEG CAT D 7813 staufen)	Eprouvettes graduées	Acide acétique glacial	Ether de pétrole
		Acide sulfurique H ₂ SO ₄	Eau distillé stérile

II.2. Méthode

Les tests phytochimiques (Screening) sont des tests qualitatifs qui permettent de caractériser les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques.

II.2.1. Tests phytochimique

Dans le but de connaître la composition de nos extraits, des tests phytochimiques sont réalisés en présence de certains réactifs de caractérisation.

II.2.1.1. Recherche des alcaloïdes (Bouquet, 1972 ; Solfo, 1973)

II.2.1.1.1. Principe

La mise en évidence des alcaloïdes consiste à les précipiter à l'aide de réactif de précipitation (réactif de Mayer), toute fois la présence des alcaloïdes n'est confirmée que lorsque cette réaction donne un précipité.

II.2.1.1.2. Mode opératoire

Après macération de 5g de feuilles séchées et broyées dans 50 ml d'HCl à 1 %, on filtre la solution obtenue et on lui ajoute quelques gouttes de réactif de Mayer qui provoque un précipité blanc indiquant la présence des alcaloïdes.

II.2.1.2. Recherche des Terpènes et des Stérols (Bouquet, 1972 ; Solfo, 1973)

II.2.1.2.1. Principe

En présence de l'acide acétique et l'acide sulfurique concentré ; l'extrait organique étheré contenant les stéroïdes et terpénoïdes donne la coloration mauve et marron.

II.2.1.2.2. Mode opératoire

5 g de la poudre végétale sont macérés dans 20 ml d'éther de pétrole, Après filtration, la phase organique est évaporée dans un bain de sable à une 0°C de 90°C. Le résidu est dissout dans 0.5 ml d'acide acétique (CH₃COOH) en ajoutant 1 ml d'Acide Sulfurique (H₂SO₄) concentré, dans la zone de contact entre les deux liquides. S'il y a apparition d'un cercle violé ou marron devenant gris par la suite, ceci indique la présence des terpènes et stérols.

II.2.1.3. Recherche des anthocyanes (Dohou et al., 2003)

II.2.1.3.1. Principe

En présence d'ammoniac et HCL concentré l'existence des anthocyanes est indiquée par le changement de couleur.

II.2.1.3.2. Mode opératoire

La recherche des anthocyanes repose sur le changement de la couleur de l'infusé à 10 % avec le changement de pH : On a été ajouté quelques gouttes d'HCl, puis quelques gouttes d'Ammoniac (NH₄OH). Le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes .

II.2.1.4. Tannins (Rizk, 1982)

II.2.1.4.1. Principe

En présence de chlorure ferrique à 1% les extraits aqueux tanniques donnent des colorations brunes vert ou bleu noir ,en fonction de type des tanins présents.

II.2.1.4.2. Mode opératoire

Une quantité de 1.5 g de poudre végétale est macérée dans 10ml de méthanol (80%) pendant 15min sous agitation, après filtration on ajoute quelque goutte de FeCl₃ a l'extrais methanolique .La couleur devient bleu noire si l'extrait contient le tanin gallique ou brune vert si l'extrait contient le tanin catéchuque.

II.2.1.5. Recherche des saponines (Dohou et al., 2003)

II.2.1.5.1. Principe

Par agitation de tube à vis produit une mousse persistante dont la hauteur est mesurable apparait dans les solutions des saponines.

II.2.1.5.2. Mode opératoire

5g de matériel végétal placés dans un Erlen meyer est décocté dans 50ml d'eau distillée pendant 30min après refroidissement et filtration prélever 5ml de filtrat et les introduire dans une tubes a essai (16 mm de diamètre et 16 mm de hauteur) après une agitation horizontal l'apparition d'un mousse persistante indique la présence des saponine.

I.2.1.6. Recherche des quinones (Dohou et al., 2003)

II.2.1.6.1. Principe

En présence de NaOH 10% les solutions des quinones présentent une coloration caractéristique virant du rouge au violet

II.2.1.6.2. Mode opératoire

Broyer 5g de matériel végétal et les humecter de quelques gouttes de HCL, mettre à macération ce matériel végétal pendant 24 heures dans un Erlen Mayer fermé et contenant 10 ml d'éther de pétrole après filtration 2 ml de filtrat sont agités avec 2 ml de NaOH à 10%, La coloration rouge virant au violet apparaît en présence de quinones .

II.2.1.7. Recherche des flavonoïdes (Dohou et al., 2003).

II.2.1.7.1.Principe

En présence de NaOH (1N), de HCL concentré et des copeaux de magnésium, les flavonoïdes donnent les réactions de coloration caractéristique .

II.2.1.7.2.Mode opératoire

5 g de matériel végétal placés dans un Erlen Mayer sont infusés dans 5 ml d'eau distillée pendant 30 minutes, après filtration prélever 6 ml d'infusé et les introduire dans 3 tubes . additionner respectivement à l'infusé contenu dans les 3 tubes à essai ,1 ml de NaOH,1ml d'eau distillée et 1 ml de HCL concentré et de copeaux de magnésium, en présence des flavonoïdes les colorations deviennent comme suit :

Rouge	—————→	Anthocyane
Jaune-rougeâtre	—————→	Flavones
Rouge à rouge violacé	—————→	Flavonols
Rouge –foncé au violet ou bleu	—————→	Flavonones
Jaune	—————→	Isoflavones

II.2.1.8. Recherche des Leucoantocyanes (Dohou et al., 2003)

II.2.1.8.1. Principe

Une réaction effectuée au bain marie en présence de NaOH (1N), HCL concentré l'apparition de la coloration jaune et rose confirme la présence de Leucoantocyanes.

II.2.8.2. Mode opération

5 g de matériel végétal placés dans un Erlen Mayer sont infusés dans 50 ml d'eau distillée chaude pendant 30 minutes, après filtration prélever 2 ml d'infusé et additionner respectivement a l'infusé ,1 ml de NaOH ,1ml d'eau distillée et 1 ml de HCL concentré, en présence des Leucoantocyanes la coloration devient jaune et rose

III. Détermination du taux des composés phénoliques totaux

III.1. Matériel destiné à la réalisation du dosage de polyphénols totaux

Déférentes matériels ont été utilisés pour réaliser le dosage de polyphénols totaux des déférentes extraites de *Peganum harmala* :

Tableau 07 : Liste d'appareils utilisés pour le dosage de polyphénols totaux

Appareil	Verrerie et autres	Réactifs et autres	Solvants et solutés
Spectrophotomètre UV-VISIBLE 1700 (PharmaSpec SHIMADZU)	tubes à hémolyse de 5 ml.	Réactif de Folin-Ciocalteu	Ethanol
Micropipettes 1001000µl (Laborgerate GmbH)			Diméthyle Sulfoxyde
Plaque chauffante agitative (IKA RH basic 2)			
Vortex (VWR VV3)	Spatules, portoirs, Picettes	Carbonate de sodium Na ₂ CO ₃	Méthanol
Etuve (Memmert)	Embouts jaunes et bleus	Acide gallique	Eau distillée
Balance de précision (ALS 286 4N)	Eprouvettes graduées Entonnoirs, Flacons en verre		Stérile

III.2. Méthode

III.2.1. Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par (Singleton et Rossi, 1965) avec le réactif de Folin-Ciocalteu (Marian et Fereidoon., 2004).

Le réactif est formé d'acide phosphotungestique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$, qui sont réduits lors de l'oxydation des polyphénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3), ce qui nous aide à doser les polyphénols dans le visible à une longueur d'onde de l'ordre 765 nm.

III.2.2. Mode opératoire

Un volume de 200 μ L des solutions des quatre extraits (0,5 mg/ml) de *Peganum Harmala*, est ajouté à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans l'eau distillée). Après 4 mn, 800 μ l de carbonates de sodium (75 g de Na_2CO_3 dans 1 litre d'eau distillée) sont additionnés. Après agitation, l'ensemble est incubé à l'ombre pendant 2heures, puis la lecture est faite à 765 nm par un spectrophotomètre UV.

L'acide gallique (00-167 μ g/ml) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage, à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée (**Li et al., 2007**).

- Répéter les opérations en triplicata pour deux expériences.

III.2.3. Méthode de calcul

La concentration en composées phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ($y = 0.0095 x - 0.0103$).

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait) et selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type (SD).

III.2.4. Analyse statistique des données

A l'aide d'un logiciel Minitab, nous avons utilisé le test ANOVA I suivi du test Tukey, pour la comparaison entre les teneurs en polyphénols totaux des quatres extraits de *Peganum harmala*.

IV. Tests d'activités biologiques

IV.1. Détermination de l'activité antioxydante (Test d'activité anti DPPH)

IV.1.1. Matériel destiné à la réalisation de l'activité antioxydante

Déférentes matériels ont été utilisés pour l'étude de l'activité antioxydante des déférentes extraites de *Peganum harmala* :

Tableau 08 : Liste d'appareils utilisés pour l'activité antioxydante

Appareil	Verrerie et autres	Réactifs et autres	Solvants et solutés
Spectrophotomètre UV-VISIBLE 1700 (PharmaSpec SHIMADZU)	Tubes à hémolyse de 5ml. Spatules	2,2 diphényl-1 picrylhydrazyl (DPPH)	Eau distillée
Vortex (VWR VV3)			
Micropipettes 100- 1000µl (Laborgerate GmbH)	Flacons en verre Papier absorbant Papier aluminium		
Micropipettes 5-50µl (SPINREACT A050804)	Plaques CCM		
Balance de précision (ALS 286 4N)	Béchers, Entonnoirs		
Plaque chauffante agitative (IKA RH basic 2)	Eprouvettes graduées Portoirs		
Etuve (Heraeus Typ 5042)	Embouts jaunes et bleus		
Lampe UV (4W/366nm)	Vaporisateur		

IV.1.2. Méthodes

IV.1.2.1. Principe

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant, peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm, provoquée par la présence des extraits (**Wu, 2007**). L'activité anti-radicalaire des extraits obtenus à partir de *Peganum harmala* est évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical DPPH. La réduction du radical DPPH, ayant une couleur violette foncée, par les groupements hydroxyles des antioxydants présents dans les extraits, conduisant à la formation d'un composé stable d'une couleur jaune. La couleur violette foncée, mesurable à 517nm, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire de l'extrait (**Locatelli et al., 2010**)

Dans ce test, le substrat est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule antioxydante, se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec perte de son absorbance caractéristique à 517 nm. Les réactions ont lieu à température ambiante, ce test est très utilisé car il est rapide, facile et non couteux (**Hadbaoui, 2012**).

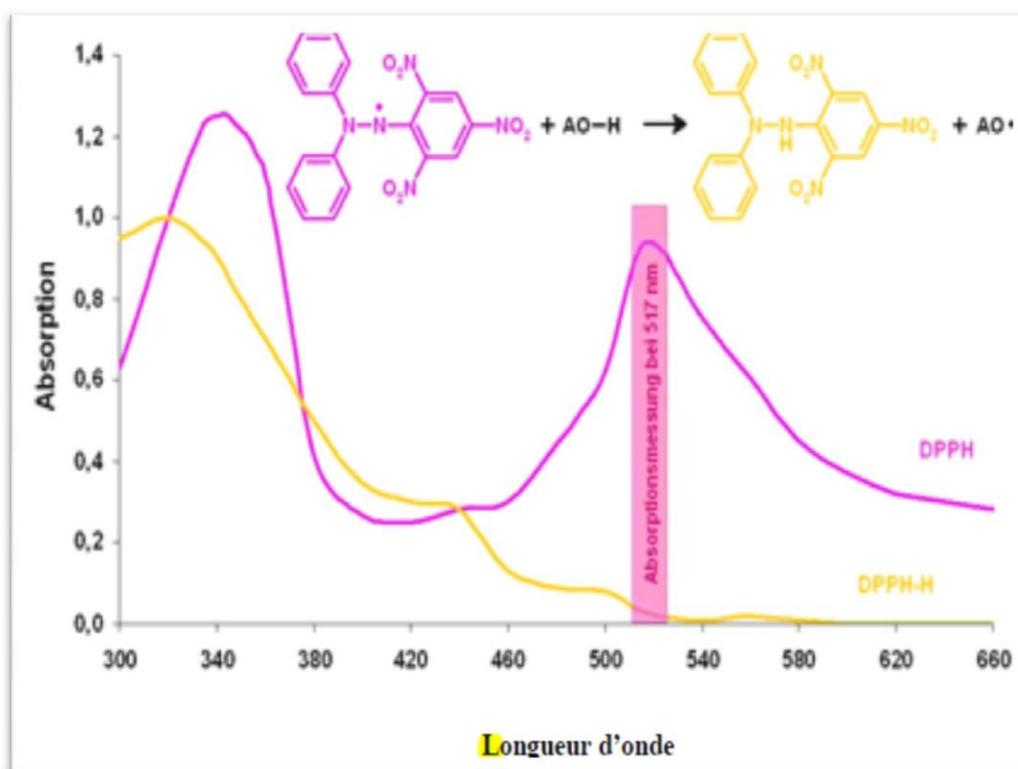


Figure 07 : Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive
(Matkowski, 2008).

IV.1.2.2. Screening par DPPH-CCM: (Chromatographie sur couche mince)

IV.1.2.2.1. Principe

Il s'agit de déposer des extraits, fractions ou produits purs à tester, sur des plaques CCM de gel de silice en aluminium et développées dans le système approprié. Après séchage, les plaques CCM sont giclées avec une solution méthanolique (1mg/ml). Des activités antiradicalaires apparaissent sous forme de spots de couleur jaune-blanc sur fond violet (Cavin, 1999).

IV.1.2.2.2. Mode opératoire

À l'aide d'un capillaire on a été déposé les 4 extraits avec des concentrations non déterminé pour la première teste et avec des mêmes concentrations (250 µL) pour la deuxième, pour chaque concentration on a été séché les spots a l'aide d'un séchoir, chaque spots a été observer par un Lamb UV-VIS avec une longueur d'ondes de 366nm. Afin de pulvériser la plaque par la solution de DPPH qui a été solubilisé dans le méthanol absolu à l'aide d'un vortex, ce dernier est examiné à l'œil nu après incubation pendant 15min à une température ambiante.

IV.2.3. Test antiradicalaire contre le DPPH mesuré au spectrophotomètre

IV.2.3.1. Principe

La méthode est réalisée par un test antiradicalaire contre le DPPH mesuré au spectrophotomètre selon le protocole de (Loo *et al.*, 2008) légèrement modifié (annexe 05) .

IV.2.3.2. Mode opératoire

Une solution méthanolique de 3 ml de DPPH (0.037 mg/ml) est mise dans un tube à essai sec et stérile. Par la suite, 100 µL de solutions des extraits sont ajoutés. Le mélange est vigoureusement agité pendant 30 secondes à l'aide du vortex. Après une incubation pendant 30 mn à l'abri de la lumière et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc, qui contient du méthanol. Le contrôle contient 100 µL de méthanol et 3 ml de solution DPPH.

- Répéter les opérations en duplicata pour deux expériences.

IV.2.3.3. Méthode de calcul

L'évaluation de l'activité antiradicalaire est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\text{Inhibition \%} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{extrait}}}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \right) \times 100$$

Abs_{blanc} : Absorbance du contrôle, **Abs_{extrait}** : Absorbance de l'extrait.

IV.2.3.4. Analyses statistiques des données

A l'aide d'un logiciel Minitab, nous avons utilisé le test STUDENT pour la comparaison de l'activité antiradicalaire entre les quatre extraits étudiées.

IV.2. Détermination de l'activité antibactérienne (diffusion en milieu gélosé)

IV.2.1. Matériel destiné à la réalisation de l'activité antibactérienne

Déférentes matériels ont été utilisés pour l'étude de l'activité antibactérienne des déférentes extraites de *Peganum harmala* :

Tableau 09 : Liste d'appareils utilisés pour l'activité antibactérienne

Appareil	Verrerie et autres	Réactifs et autres	Solvants et solutés
Balance de précision (ALS 286 4N)	Tubes à vis 16x160mm.	Tween 20	Ethanol
Plaque chauffante agitative (IKA RH basic 2)	Embouts jaunes et bleus	Milieu solide Mueller-Hinton (MH).	Tween 20
Microscope optique (OPTICA AXIOM 2000)	Eprouvettes graduées	Gélose nutritive	Eau distillée stérile
Etuve (DLAB TECH DAI HAN co LTD)	Entonnoirs	Bouillon nutritif (BN)	Eau physiologique stérile
Etuve (HeraeusTyp 5042)	Ecouvillons	Violet de gentiane	
Bec benzène	Pipettes Pasteur	Lugol	
Micropipettes 100-1000µl (LaborgerateGmbH)	Boîtes de Pétri	Fushine	
Micropipettes 5-50µl (SPINREACT A050804)	Cristallisoirs, Para film		
Vortex (VWR VV3), Lampe UV 4W/366nm	Papier aluminium Papier absorbant		

IV.2.2. Méthode

IV.2.2.1. Principe

Les diamètres des zones d'inhibition (DZI) ont été déterminés *in vitro* sur une seule Bactérie, selon la méthode de diffusion en milieu solide sur milieu gélose de Mueller-Hinton, telle que décrite par (Kirby-Bauer *et al.*, 1966) et reprise par (Kechkar, 2008).

IV.2.2.2. Bactérie d'étude

Dans notre étude, nous avons utilisé une souche bactérienne fournie par l'American Type Culture Collection (ATCC).

La souche bactérienne ATCC, nous a été fournie par le laboratoire de microbiologie, université Badji Mokhtar, ANNABA. Il s'agit de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, que nous avons conservé à 4 C° dans des tubes à vis contenant de la gélose nutritive inclinée.

IV.2.2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Ce germe appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. Bacille à Gram négatif, aérobie, aspérulé très mobile par un ou plusieurs flagelles polaires. Il s'agit de bactéries d'altération ou pathogènes (parfois même redoutable ou mortelle). *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est capable de pousser à des températures entre 4-42 C° (**Figure 08**) (Mann *et al.*, 2000).

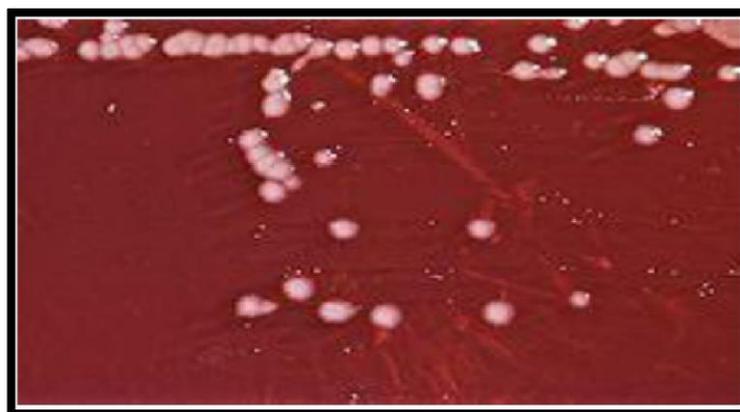


Figure 08: *Pseudomonas aeruginosa* au microscope électronique à balayage (Mann *et al.*, 2000).

IV.2.2.3. Mode opératoire

IV.2.2.3.1. Préparation des inoculums

IV.2.2.3.1.1. Enrichissement

Deux colonies bien séparées et uniformes des espèces bactériennes concernées, ont été Prélevées, à l'aide d'une anse de platine, pour être homogénéisées dans 5 mL de bouillon nutritif (25 g de BN dans un litre d'eau distillée stérile), puis portées à l'incubation pendant 18-24 h à 37°C dans l'étuve.

Pour chaque bactérie préparer trois tubes à vis.

IV.2.2.3.3.2. Préparation de la suspension bactérienne

Dans 5 mL d'eau physiologique stérile, 500 µL de la suspension de la souche bactérienne ATCC enrichie dans le BN ont été mis durant 18-24 h présentant une turbidité élevée.

IV.2.2.3.3.3. Ensemencement / Test antibactérien

Mettre 13 mL de la gélose MH dans chaque boîte de pétri (épaisseur de 5 mm) et laisser sécher pendant 15 mn à température ambiante de laboratoire dans la zone stérile du bec

bunsen. A l'aide d'un écouvillon stérile, ensemercer, sous forme de stries serrées, la bactérie d'étude. Ensuite, inonder la surface de la gélose avec 1 mL de la suspension bactérienne et laisser pendant 15 mn à température ambiante. Par la suite, éliminer l'excès de la suspension bactérienne. Creuser trois puits (diamètre 6 mm) dans chaque boîte de pétri, à l'aide d'une pipette pasteur stérile, dans lesquels 15 µL d'extrait d'étude (10 mg/mL) sont introduits. Laisser à température ambiante, pendant 2 h, pour la prédiffusion et incubé pendant 18-24 h à 37 °C dans l'étuve.

- Les essais ont été effectués en triplicata pour chaque extrait, vis-à-vis d'une bactérie donnée, pour deux expériences.

Remarque :

La paillasse de travail ainsi que les mains du manipulateur sont nettoyées préalablement à l'alcool. Quant aux manipulations, elles sont effectuées autour de la flamme de bec Bunsen.

IV.2.2.3.3.4. Lecture

L'apparition d'une zone claire autour des puits (à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée), indique l'action antibactérienne de l'extrait de la plante vis-à-vis la souche bactérienne testée. Les diamètres sont mesurés à l'aide d'une règle graduée. Les résultats obtenus sont exprimés en millimètre. Les bactéries seront classées selon le diamètre d'inhibition dans l'une des catégories suivantes : résistance, sensibilité limitée, sensibilité moyenne et très sensible (**Duraffourd et Lapraz, 2002**) comme le montre le Tableau 10.

Tableau 10 : Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition (**Duraffourd et Lapraz, 2002**).

Diamètre du halo d'inhibition (X)	Degré de sensibilité des germes	Résultat
$X \leq 8$ mm	Résistante	-
$8 \text{ mm} < X < 14$ mm	Sensibilité limitée	+
$14 \text{ mm} < X < 20$ mm	Sensibilité moyenne	++
$X \geq 20$ mm	Très sensible	+++

IV.2.3. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

IV.2.3.1. Principe

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard de souches utilisées et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier.

IV.2.3.2. Mode opératoire

L'antibiogramme est réalisé sur une bactérie sensible à nos extraits d'étude qui est : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Les antibiotiques utilisés pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont : Ticaracilline + acide clavulanique 85 µg, Ceftazidime 30 µg, Gentamycine 10 µg, Amikacine 30 µg, Colistine 10 µg, Aztreonam 30 µg, Ampicilline 10 µg et Ceftaxime 30 µg.

Déposer les disques d'antibiotiques dans des boîtes de pétri contenant 13 mL de milieu de MH gélifié, ensemencée avec la bactérie d'étude. Incuber pendant 18-24 h à 37°C dans l'étuve. Les résultats obtenus sont exprimés en millimètre (diamètres des zones d'inhibition).

- Les essais ont été effectués en deux expériences pour chaque antibiotique et pour chaque espèce bactérienne étudiée. Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type (SD).

Résultat et discussion

I. Extraction

Nos résultats montrent que chaque extrait *Peganum harmala* est caractérisé par une couleur et un rendement par rapport à la matière sèche. Ces éléments sont présentés dans le (Tableau 11).

Tableau 11 : Résultats des rendements par rapport à 25g de matière sèche, aspects et couleurs des extraits de *Peganum harmala*.

Extrait	Aspect	Masse (g)	Rendement (%)
EP	Crème de couleur vert	0,6	2,6
DM	Cire de couleur vert	0,5	2
AE	Poudre de couleur marron	0,2	0,7
MeOH	Cire de couleur vert foncé	2,8	11,1

EP : Ether de pétrol ; DM : Dichlorométhane ; AE : Acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol

Les résultats obtenus après l'extraction de *Peganum harmala*, indiquent que cette plante contient une teneur remarquable de composés extractibles. Ainsi, il est clair que l'utilisation des solvants à polarités différentes, a permis de séparer les différents métabolites selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et leur complexité structurale.

L'extraction de la partie aérienne de la plante, a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés. En effet, le rendement de *Peganum harmala* en différents extraits variées entre 0,7% pour l'extrait acétate d'éthyle et 11,1% pour l'extrait méthanolique (Tableau 11). Le rendement d'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir le temps, la température et le solvant utilisé dans l'extraction (Su *et al.*, 2006).

Un résultat comparable a été rapporté par Edziri *et al.* (2010), qui ont étudié les parties aériennes de *Peganum harmala* par l'utilisation de même solvants d'extractions que les nôtres. L'extrait méthanolique donne le rendement d'extraction le plus élevé 17,75 %. Cette valeur est plus élevée que la notre. Dans cette même étude, les rendements d'extractions des deux autres extraits Ep et AE sont plus faible que nos résultat 0,02% ; 0,34%, respectivement. Dans une autre étude, Rezzagui (2012) a rapporté un rendement des graines *Peganum harmala* en l'extrait methanolique le plus élevé 20,18%. Ces différences peuvent être dues à différents facteurs tels que la saison, la température, la région et la partie de la plante.

II. Les tests phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur la partie aérienne de *Peganum harmala*, ont permis de détecter les différentes familles de composés existant dans la plante d'étude, par des réactions qualitatives de caractérisation. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Composés chimiques identifiées dans *Peganum harmala*.

Composés chimiques	indicateur de présence	Résultats
Tannins	Coloration brune vert	++
Flavonoïdes	Jaune claire	+ (Isoflavonol)
Saponosides	HM <1 cm après 15 min	+
Stérols et triterpènes	Anneau gris	-
Alcaloïdes	Louche flocculant ou Précipité	Floculation fort +++
Quinones	Marron	-
Anthocyanes	Changement de Couleur (Vert)	+
Leuco anthocyanes	Marron rouge	+

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif + : Faiblement positif ; - : Négatif

Les résultats présentés dans ce tableau sont d'ordre qualitatif. Les tests employés permettent d'indiquer la présence ou l'absence des composés ciblés avec une évaluation sommaire sur l'abondance de ces composés. Nos résultats révèlent que le *Peganum harmala* est particulièrement riche en alcaloïdes, suivis par les tannins de type catéchique en deuxième position. La présence des autres composés est modérée. Nous avons noté l'absence complète de quinones, stérols et terpènes. Ces résultats expliquent le rendement élevé de notre plante en extraits méthanoliques (**Tableau 11**).

La même constatation a été aussi mentionnée par (**Rezzagui, 2012**) qui a démontré que les graines de *Peganum harmala* sont très riches en métabolites secondaires (Alcaloïdes, Flavonoïdes, Quinones Tannins, Coumarines ...). Nos résultats concordent avec ceux obtenus par **Rezzagui (2012)** et **Habbachi (2013)** qui ont rapporté des teneurs en alcaloïdes comparable aux nôtres. Cette constatation est appuyée par les conclusions faite par **Berrougui**

(2006) qui indique que parmi les espèces de la famille des zygophyllaceae *Peganum harmala* est particulièrement riche en alcaloïdes.

III. Dosage des polyphénols totaux

III.1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Le contenu total de polyphénols dans le *Peganum harmala* a été estimé selon la méthode colorimétrique basée sur le réactif de Folin Ciocalteu en utilisant comme standard l'acide gallique. Cette méthode est basée sur la réaction d'oxydoréduction entre les phénols présents dans les extraits et le réactif de Folin– Ciocalteu

La quantité des polyphénols totaux a été rapportée en microgramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait). Nous allons développer le dosage par rapport à une courbe d'étalonnage (Figure 7).

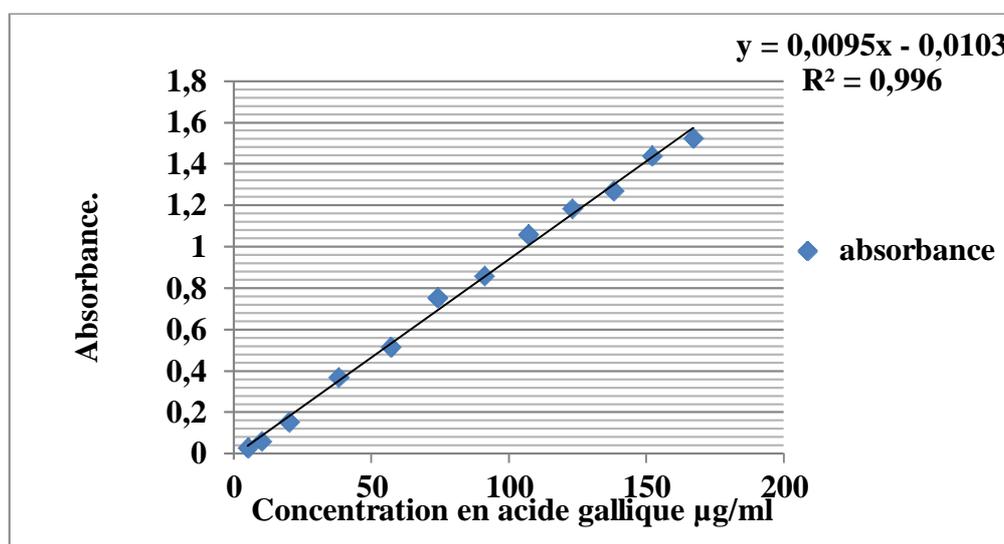


Figure 09: Droite d'étalonnage de l'acide gallique

III.2. Teneur des extraits en polyphénols

Le choix de quantifier les polyphénols parmi les autres substances phytochimiques est basé sur l'importance de ce groupe de métabolites secondaires qui est très largement répandu dans le règne végétal (Ozsoy et al., 2008).

Tableau 13 : Teneur en polyphénols totaux (en μg EAG/mg) des extraits de *Peganum harmala* (0.5mg/ml).

Extrait	Concentration (μg EAG/mg d'extrait)	Ecartype (μg EAG/mg d'extrait)
EP	43,5 ^a	5,4
DM	51,8 ^a	2,2
AE	49,0 ^a	3,0
MeOH	94,0 ^b	2,8

EP : Ether de pétrol ; DM : Dichlorométhane ; AE : Acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol

a, b : Les moyennes affectées par des lettres différentes dans la même colonne signifie un résultats significativement différent ($P = 0,000$).

Nos résultats montrent que l'extrait méthanolique est significativement la fraction la plus riche en composés phénoliques (**Tableau 13 et Annexe 01**) avec un teneur de 94,03 μg EAG/mg suivis par l'extraits de dichlorométhane et d'éthyle d'acétate qui sont presque identiques 51,8 μg EAG/mg et 49,0 μg EAG/mg respectivement. En revanche, l'extrait éthérique a enregistré la teneur la plus faible 43,5 μg EAG/mg.

La comparaison de nos résultats avec **Edziri et al. (2010)** confirme la richesse de l'extrait méthanolique en composés polyphénoliques. En effet, ces auteurs rapportent une teneur en extrait méthanolique de 117,45 μg EAG/mg et un faible teneur en l'extrait d'acétate d'éthyle 28 μg EAG/mg. De même, **Rezzagui (2012)** a également trouvé que la teneur de l'extrait méthanolique des grains de *Peganum harmala* en polyphénols est faible que la notre 79,73 μg EAG/mg alors que celle de l'extrait acétate d'éthyle en est plus élevé 65,69 μg EAG/mg. Ces différences trouvent son explication dans la différence des parties de la plante étudiées (**Meddour, 2011**).

Noter que la teneur en composés phénoliques de l'extrait méthanolique confirme le résultat du rendement qui signale le meilleur rendement.

IV. Etude de l'activité antioxydante

L'activité antiradicalaire des différents extraits a été évaluée par le test de DPPH. Celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi et al., 2008).

IV.1. Tests par CCM-DPPH

A l'aide d'une plaque CCM, une étude qualitative d'orientation a été réalisé en deux tests. Un test a été fait avec des concentrations aléatoires des extraits d'étude et un autre avec des concentrations précises (spots de 250 µl d'une solution mère de 1mg/ml). Ces concentrations ont été déposées dans la plaque CCM et examinées sous lumière UV, après le contact avec la solution méthanolique de DPPH.

Les résultats de premier test montrent que la meilleure activité antiradicalaire a été signalée par l'extrait AE, suivi par EP, MeOH et DM, par ordre décroissant de potentiel antioxydant (Figure10). Dans le deuxième test CCM-DPPH, les résultats montrent que la meilleure activité antiradicalaire a été signalée par l'extrait méthanolique suivi par une faible activité de l'extrait étheré. En revanche, les deux extraits acétate d'éthyle et dichlorométhane sont presque incolores sur la plaque CCM, ceux-ci expliquent l'absence de l'activité antiradicalaire.

Parmi ces deux tests : nous avons suivi le deuxième, à cause de sa précision

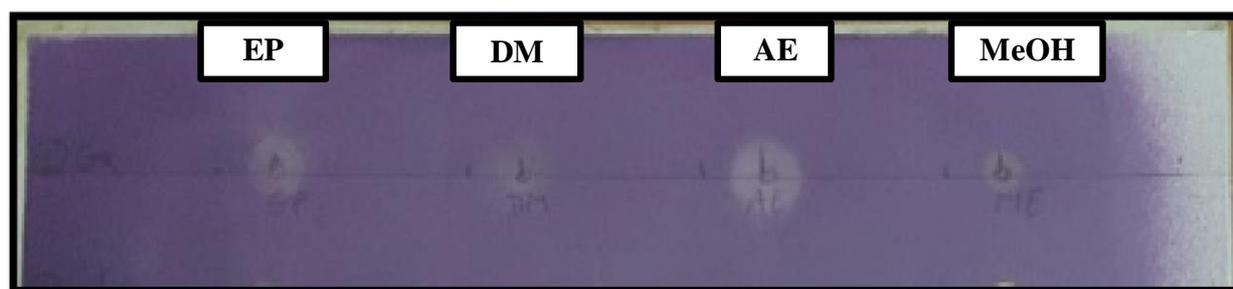


Figure10 : Résultat de plaque CCM-DPPH des quatres extraits de *Peganum harmala* (concentration aléatoire de solution mère d'extrait)

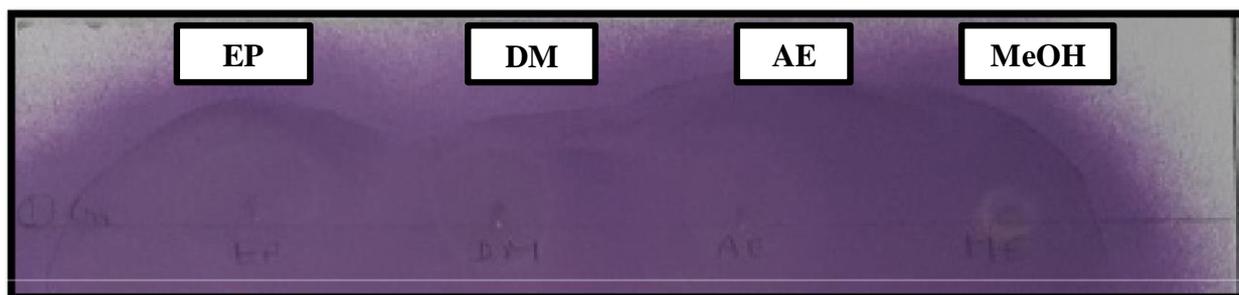


Figure 11: Résultat de plaque CCM-DPPH des quatre extraits de *Peganum harmala* (250 μ L de solution mère d'extrait (1 mg/ml))

IV.2. L'activité antiradicalaire contre le DPPH

Les résultats de screening CCM-DPPH présenté dans le paragraphe précédant, nous ont permis de réaliser l'étude quantitative sur uniquement les extrais méthanolique et étheré.

L'activité antiradicalaire des extraits méthanolique et de l'éther de pétrole de *Peganum harmala* a été déterminée par la méthode de DPPH.

- Pour chaque extrait de plante, deux expériences ont été réalisées, trois répétitions pour l'extrait méthanolique et deux répétitions pour l'extrait de l'éther de pétrol ont été faites.

Tableau 14 : L'activité antiradicalaire contre le DPPH des extraits méthanolique et étheré de *Peganum harmala* (5mg/ml)

Extrait	Pourcentage	Ecartype
EP	17,15 ^a	13,74
MeOH	41,20 ^a	6,25

EP : Ether de pétrol ; MeOH : méthanol

a : Les moyennes affectées par la même lettre dans la même colonne signifie un résultat statistiquement différent ($P = 0,069$).

Dans notre étude l'évaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH, a révélé un pouvoir antioxydant plus élevé pour l'extrait méthanolique avec un teneur de 41,20 %, suivi par l'extrait étheré avec une activité de 17,15 % (**Tableau 14 et Annexe 02**).

Les résultats de l'activité antiradicalaire obtenus sont en accord avec ceux d'Edziri *et al.*, 2002). Ces derniers ont été constaté que les extraits méthanolique et étheré de la partie aérienne de *Peganum harmala* ont des activités antioxydantes.

Le test statistique montre qu'il n'est y a pas une différence significative entre l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique et étheré.

Les tests phytochimiques montrent une grande diversité dans les profils phytochimiques de la plantes étudiée avec une prédominance des alcaloïdes, polyphénols..., ce qui laisse suggérer que l'activité antioxydante enregistrée est due essentiellement à ces composés comme le montrent clairement les corrélations statistiques.

V. Etude de l'activité antibactérienne

Le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est tributaire de leurs compositions chimiques. L'activité antibactérienne des quatre extraits de *Peganum harmala*, a été évaluée dans cette étude par la technique de diffusion sur la gélose Mueller-Hinton, vis-à-vis d'une bactérie pathogène (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), après 24 heures d'incubation dans le premier test et après 48 heures dans le deuxième test à une température adéquate de 37°C.

V.1. La coloration de Gram

La pureté de la bactérie qui a servi pour ces expériences, a été vérifiée par la coloration de Gram (**annexe 04**). Leurs caractères morphologiques sont résumés dans la (**Figure12**)



Figure12: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 au microscope optique (x100)

V.2. Test de sensibilité aux extraits d'étude

Les résultats révèlent que les quatres extraits de *Peganum harmala*, exercent un effet antibactérien considérable sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (**Tableau 15**)

Tableau 15 : Détermination du diamètre de la zone d'inhibition (mm) de quatre extraits de *Peganum Harmala*.

Bactéries d'étude	Ether de pétrol	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	Méthanol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Test 01 (Après 24h)			
	13,13 ± 0,29 (+)	16,5 ± 1,37 (++)	16,26 ± 0,75 (++)	18,91 ± 0,80 (++)
	Test 02 (Après 48h)			
	27,012 ± 2,39 (+++)	25,71 ± 1,07 (+++)	21,66 ± 1,57 (+++)	23,62 ± 0,97 (+++)

(+) : Sensibilité limitée ; (++) : Sensibilité moyenne ;(+++) : très sensible

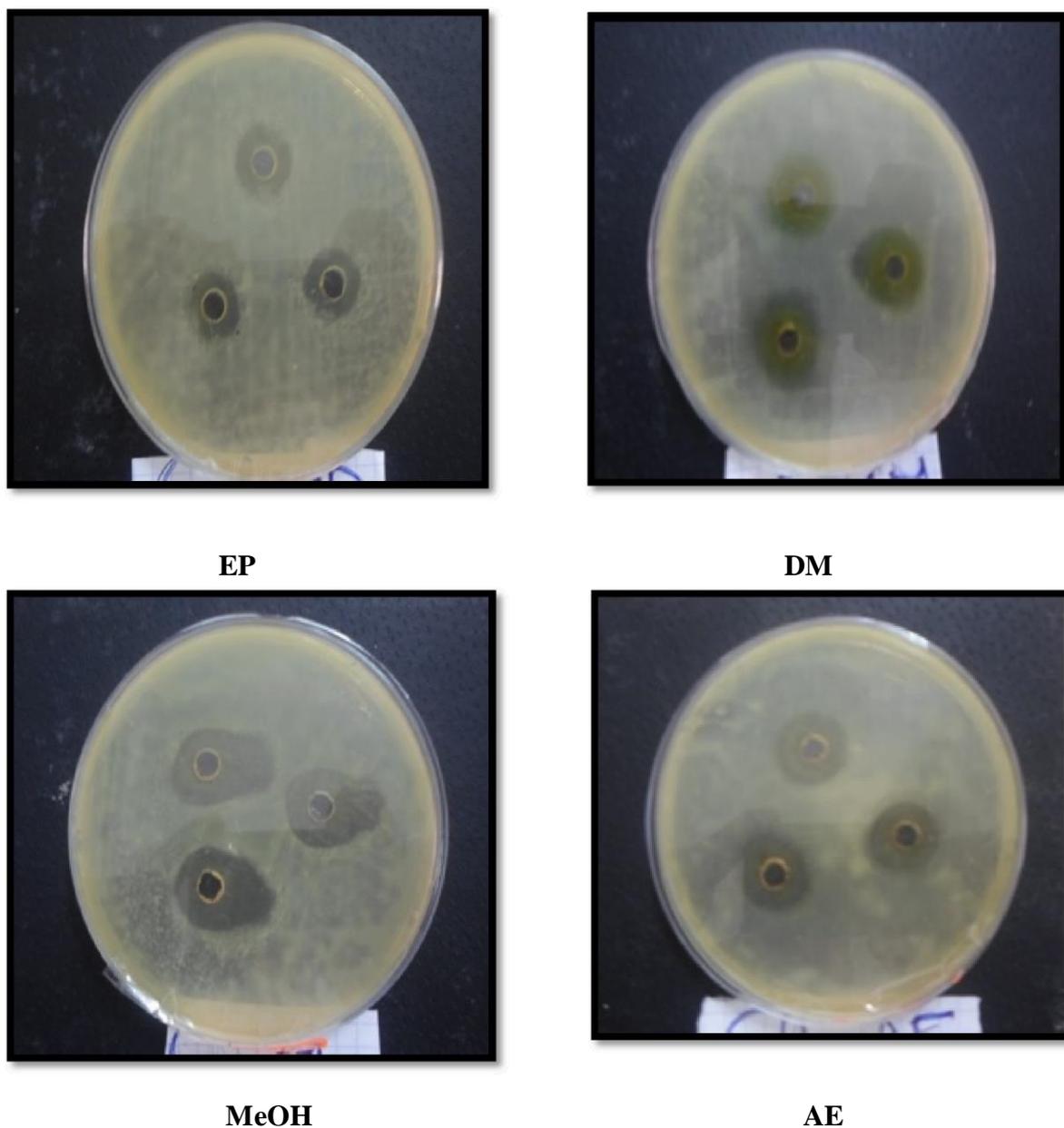


Figure 13 : Effet inhibiteur des quatres extraits de *Peganum Harmala* sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (24 h à 37°).

Les résultats montrent que les quatres extraits possèdent un effet inhibiteur sur la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Concernant le premier test, la meilleure zone d'inhibition a été enregistré par l'extrait methanolique $18,91 \pm 0,80$ mm, suivi par les deux extraits déchlorométhane et acétate d'éthyle $16,5 \pm 1,37$, $16,26 \pm 0,75$ mm, respectivement, avec une sensibilité moyenne, et d'autre part la sensibilité est limitée pour l'extrait éthéré ($13,13 \pm 0,29$ mm

Les résultats du deuxième test montrent que les quatres extraits de *Peganum harmala* sont très actifs sur la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En comparant les deux tests, le diamètre des zones d'inhibition est proportionnel à la période d'incubation à 37⁰ C.

Ces résultats sont conformes à ceux d'**Aniseh *et al.*, (2012)** sur la même souche, où l'extrait méthanolique présente des zones d'inhibition.

Par comparaison, avec **prashanth et John (1999)** a trouvé également que l'extrait méthanolique de *Peganum harmala* possède la meilleure activité antibactérienne par rapport à l'extrait éthéré, ce qui confirme le résultat du premier test.

V.3. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques (**photos 06**).

Le **Tableau 16 et annex 03** reporte les valeurs (mm) des diamètres des zones d'inhibitions des antibiotiques rapportés sensibles pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

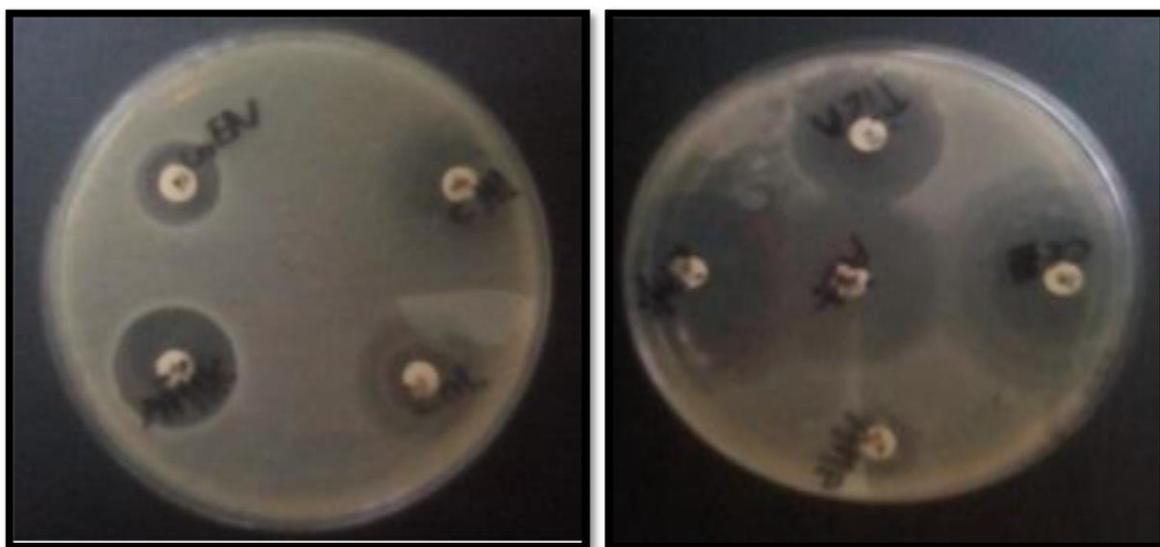


Figure14 : Effet inhibiteur des antibiotiques sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Abidet et Mebarki, 2015).

Tableau 16 : Antibiogramme des bactéries sensibles aux extraits d'étude, étudiées en présence des différents antibiotiques.

	Zone d'inhibition							
	GNT	AMI	TCC	CS	ATM	AMP	CTX	CAZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15 ± 0.00 (++)	22.25 ± 0.35 (+++)	27.5 ± 0.35 (+++)	13 ± 0.00 (+)	30 ± 0.00 (+++)	15.13 ± 0.18 (++)	30 ± 0.00 (+++)	24 ± 0.00 (++)

(+) : Sensibilité limitée ; (++) : Sensibilité moyenne ; (+++) : Très sensible.

GNT : Gentamycine ; **AMI** : Amikacine ; **TCC** : Ticaracilline + acide clavulanique ; **CS** : Colistine ; **ATM** : Aztreonam ; **AMP** : Ampicilline ; **CTX** : Ceftaxime ; **CAZ** : Ceftazidime.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 a montré des sensibilités différentes aux antibiotiques testés.

Nous avons trouvé que les effets antibactériens de notre plante vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* de test 01 s'approchent de ceux de la Gentamycine, Colistine et Ampicilline $15 \pm 0,00$; $13 \pm 0,00$ et $15,13 \pm 0,18$ mm, respectivement, mais reste faible par rapport à ceux de Ticaracilline, Acide clavulanique, Ceftazidime, Amikacine, Aztreonam et Ceftaxime $27,5 \pm 0,35$; $24 \pm 0,00$; $22,25 \pm 0,35$; $30 \pm 0,00$ et $30 \pm 0,00$ mm, respectivement.

Par contre les effets antibactériens de notre plante vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* de test2 s'approchent de ceux Aztreonam, Ceftazidime, Ticaracilline 30 ± 0.00 ; 24 ± 0.00 ; 27.5 ± 0.35 mm, respectivement mais reste plus supérieure a Colistine 13 ± 0.00 mm .

Conclusion

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes steppiques Algériennes. Elle a pour objectif général de rechercher les éventuelles activités antioxydantes et antibactériennes des différents extraits de la partie aérienne de *Peganum harmala* en passant par l'extraction et l'étude phytochimique de ses différents extraits.

Les résultats obtenus ont révélé la richesse de *Peganum harmala* en composés extractibles. En effet, le rendement des différents extraits variait de 0,68% à 11,13. Les quatre extraits étudiés contiennent les composés phénoliques à des taux variables. L'extrait le plus riche en polyphénols est l'extrait méthanolique avec un taux de 94%.

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH, a révélé une réponse antioxydante pour les deux extraits méthanolique et étheré. L'activité antiradicalaire de ces deux extraits était de 41,20% et 17,15% , respectivement.

De plus, nos résultats montrent que les quatre extraits de *Peganum harmala*, ont présenté une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 comparable à celle des antibiotiques testés.

Les résultats de la présente étude soulignent l'importance *Peganum harmala* en tant que source de principes actifs ayant un intérêt pharmacologique et thérapeutique certains. Ceci maintient la position de *Peganum harmala* dans la panoplie des plantes médicinales et soutient son utilisation traditionnelle. Malgré cette utilisation, *Peganum harmala* reste mal employé dans la phytothérapie moderne, car elle présente des risques de toxicité. Des études futures sur la toxicité de cette plante paraissent nécessaires. De même, des études à l'échelle moléculaire pour approfondir la recherche des composés de *Peganum harmala* (identification et purification des composés phénoliques), et investir les mécanismes exacts par lesquels ces composés accomplissent leurs effets antioxydants et cytotoxiques sont également nécessaires.

A

Agedilova.M, Turmukhambetov .A, Schultz. E, Shakirov. M, Adekenov S. *Chemistry of Natural Compounds.*, 2006, PP226, 227 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbas-(Sétif) ,2012

Akroum .S, mémoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie Mentouri de Constantine, 2006.

Ali .H. S, Ramadan .M. T, Ragab .G. H, Kamil .M. M, Eissa .H. A. *American Science.*, 2011, 579-592- in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vieMohamed Khider – Biskra.

Ames .B. N, Shigenaga .K, Hagen .T. M, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* , 1993, 7915-7922.in thèse de doctorat Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.*

Anonyme, Larousse,2007, 244-245in *Lebanese Science Journal, Vol. 14, No. 1, 2013.*

applications. Cambridge, Wood head Publishing Limited, New York,USA, 2001, 108- 109 in memoire de magister Université d'Oran Es-Sénia

Arisi A. C. M, Cornic. G, Jouanin .L, Foyer C. H, *Plant Physiology* 1998, 565-574. 115 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vieMohamed Khider – Biskra.

Aruoma.O.I, Mut Res, 2003,523,524 in *Journal of Applied Biosciences* 84:7636– 7643 ISSN 1997–5902

Asad.S, Bajwa.R, 6th National Weed Science Conference., 2005, pp16 .

Asada. Y, Oshikawa ,T, Welli, *Planta medica*,1998,746,747in memoire de magister univercity SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE ET SCIENCES DE LA MATIERE

Asilbekova .D, *Chemistry of Natural Compounds.*, 2006, 223, 224,22535 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbas-(Sétif),2012

B

- Baghiani .A, Djarmouni .M, Boumerfeg .S, Trabsa H., Charef .N, Khennouf .S, L. Arrar *European Journal of Medicinal Plants.*, 2012, 42-56 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif),2012
- Bartosz G. *Commets on Toxicology.*, 2003, 9, 5-21.in *Revue de génie industriel* 2009, 4,25 39.
- Bauer. S.W, Kirby. W.M, Sherris. J.C, Thurck. M,American Journal of Pathology.,1966, pp493-496776in mémoire de master Université des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie Larbi Tébéssi – Tébéssa
- Bédane .C, *Photodermatologie : Photobiologie cutanée, photoprotection et photothérapie*, Edition Wolters Kluwer France, 2008, p p20
- Benaissa .B, thèse de doctorat , université de Toulouse , France,2012
- Bénard. C, Thèse de Doctorat : Université de NANCY, 2009, in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra
- Berrougui. H, Cordero .C.M, Khalil .A, Hmamouchia. M, Eттаib .A, Marhuenda. E, Herrera .M.D. *Pharmacol Res.*, 2006, 150-157 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif),2012
- Beta.T, Nam.S. Dexter, Sapirstein. J.H,Chem,2005, 390-393 in *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie : 57 – 63*
- Boldyrev. A. A, *Int. J. Biochem*, 1993, 1101-1107.in thèse de doctorat Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.*
- Bolton .J. L, Trush. M. A, Penning .T. M, Dryhurst .G, G, J.Monks .T. *Chem.*, 2000, 13, 135.in thèse de doctorat Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.*
- Boudjouref .M, mémoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie Ferhat Abbas – Sétif, 2011 in *memoire de master université des Sciences de la Nature et de la Vie, ouargla*
- Bousseboua .H, *Eléments de microbiologie générale*, 2001; 2006 pp32, 160-167in mémoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie Mentouri de Constantine.

Boyd B, Ford .C, Koepke .M.C, Gary. K, Horn .E, McAnalley .S, McAnalley. B. *Glycoscience & Nutrition.*, 2003, 7 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie Ferhat Abbes, Sétif

Brigitte .M., and Culinary Delight With the Raw Foods Diet.,2009,154-155 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra.

Brigitte. S, biologie microbiologie : résumé de cours, exercices corrigés et commentés , ed Ellipses ,France,2006,pp 272-276

Bruneton .J, Elément de phytochimie et de pharmacognosie. Ed. Tech, Doc, France, 1987, 47. in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif) ,2012.

Bruneton .J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3 Edition, Editeur technique et documentation, Paris, 1999

C

Caccamese.S.C, Caruso. N.p, Savarino. A. pp1076, 155328 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-Sétif,2012.

Cavin .A, Thèse de Doctorat Université de Lausanne ,Suisse,pp242.

Céline L, thèse de doctorat université de Strasbourg,2011 Lavoisier in mémoire de magister UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE.

Chen .Q, Chao .R, Chen. H, Hou. X, Yan .H, Zhou .S, Peng .W, Xu. A,Int, Cancer. J, 2005, 114, 675,682. in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie Ferhat Abbes-(Sétif) ,2012

CHETLEY .A, Médicaments à problèmes, édition ReMed, Paris, 2000, pp405 in thèse de doctorat UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

Chopra I.C, Abral .B. K, Handa .K.L. Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique, Ed UNESCO, 1960, pp48.in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif), 2012

Cowan .M. M, *Clinical Microbiology reviews.*, 1999,564-570 in Université des Sciences de la Nature et de la Vie, Constantine

Cristina. P, Ilonka.S, Bartek .T, *génie industriel.*,2009, 4, 25-39

D

Dai .J, Mumper .R. J. *Molecules.*, 2010, 52,7313 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra

Diatta, Les plantes médicinales utilisées contre les dermatoses dans la pharmacopée Bainouk de Djibonker, région de Ziguinchor, sénégal, 2013,5600 *in memoire de master université des Sciences de la Nature et de la Vie, ouargla*

Dicko. M. H, Gruppen. H, Traoré .A. S, Voragen. A. G. J, Van Berkel. W. J. H,*Biotechnology and Molecular Biology Review.*, 2006,21-38 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra

Djeridane .A, Yousfi.M, Nadjemi .B, Boutassouna.D, Stocker .P, Vidal. N., *Food Chemistry.*, 2006,654-660 in Université des Sciences de la Nature et de la Vie, Constantine

Droillard .M. J , Paulin. A,*Plant Physiology.*, 1990, 1187- 1192. 115 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra.

Druyne.T, *Biochemical Systematics and ecology.*, 1999,445,459 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif),2012.

Duraffourd .C, Lapraz .J.C, *Phytothérapie clinique. Endobiogénie et Médecine*, Edition Masson, paris, 2002 in mémoire de master Université des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie Larbi Tébéssi – Tébéssa

E

E. Pelletier, P. G. C. Campbell, F. Denizeau. *Edition PUQ.*, 2004, 182.in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra.

Edziri. H, Mastouri .M, Mahjoub .M.A, Patrich .G, Matieu .M, Ammar .S, Ali .S.M, Laurent .G, Zine .M, Aouni .M. *Toxicological & Environmental Chemistry.*,2010

El Allagui.N .E. Saïda, Mohamed .B. Abdel hakim. *Acta Botanica Gallica.*, 2007,503,509.

El Allagui.N, Bourijate. M, Tahrouch .S, Hatimi. A, *Congrès International de Biochimie* (Agadir),2006, 357-360 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif),2012

Elodie .G, thèse de doctorat, UNIVERSITE DE CORSE-PASQUALE PAOLI ,ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE

F

Farouk. L, Laroubi .A, Ouachrif .A, Aboufatima .R, Benharref .A, Chait .A . *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics.*, 2009,29-35 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-Sétif, 2012

Farzin .D, Mansouri. N, Neuropsychopharmacol., 2006, 16,324-328 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif) ,2012.

Favier .A *L'actualité chimique.* 2003, 108-115 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra.

Fonseca Maria .J.V, *AAPS Pharm Sci*,2003,1-5

G

Georgetti.S.R, Casagrande .R, Mambro.Di, Azzolini. V.M, Ana .E.C.S.,

Goudable .J, Favier. A.*Nutrition Clinique et Métabolisme*, 1997, 120,115 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider– Biskra.

Guillaume. (2000), Www. Second euro-bioweb.com/microbiologie/ microbiologie cours.

Gutteridge .J.M, Halliwell. B. *Ann NY Acad Sci.*, 2000, 136-47in revue MEDECINE/SCIENCES 2006, 22, 266-72

Gutteridge. J.M. . *Commun19.*, 1993, 141-158. in mémoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie Ferhat Abbes, Sétif

H

Hadbaoui.Z, Thèse de Doctorat: Université DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERSde Kasdi Merbah auargla,

2012,1655 in mémoire de master Université des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie Larbi Tébessi – Tébessa

Halliwell .B, Gutteridge .J. M, Cross ,C. E, where are we now.,1992 , 119

Hammiche .V, Merad.R., Laboratoire de botanique médicale, INESSM d'Alger, Ed MO Rambourg Schepens, 1997, in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif),2012.

Hellal. Z, Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou,2012.

Hoffmann. D. *Edition Inner Traditions / Bear & Co, 2003, pp90* in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra

<http://faculty.ksu.edu.sa/Al-Rowaily/> Pictures, Library/Rangeland,Flora/Peganum harmala.bmp inmemoire de magister , Université des Sciences de la Nature et de la Vie - Ferhat Abbes-(Sétif), 2011

http://healthyhomegardening.com/images/gardengeek/syrian_rue.jpg

J

J.PERRY .J, T.Staley .J, Stephen .L. PCEM.PCEP.1^{er} cycle /licence.2^ecycle /Master, France, 2004, pp164.

Jacques .F, Cuisiner vite et bon : la bonne cuisine minceur, *Odile Jacob Ed, 2007,p258* .

Halliwell, J. M. C. Gutteridge. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 501-514 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra.

Jacques.B, André.R , Biochimie métabolique, ellipses Ed, Paris, 2004,pp 217,219,220,223,225 in mémoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie Ferhat Abbes, Sétif

Jha .P, Flather .M., Lonn. E, Farkouh. M, Jusuf.S, *Ann.*, 1995, 123,860 in thèse de doctorat université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.*

K

Kartal. M, Altun. M.L, Kurucu. S, *Journal of Pharmacological and Biomédical Analysis.*, 2003,263-269 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie - Ferhat Abbas-Sétif, 2012.

Kechkar.M.M, Mémoire du Magister de l'Université Mentouri, Constantine, 2008in mémoire de master Université des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie Larbi Tébessi – Tébessa

Khashimov .K, Telezhenetskaya .M, Yunusov. S. *Chemistry of Natural Compounds.*, 1996, 381,382 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbas-Sétif, 2012

Kurachko .K, Umarov .A, Markman. A. *Chemistry of Natural Compounds.*, 1969,358-359 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbas-Sétif, 2012

L

Lamchouri. F. A, Settaf .Y, Cherrah .M, N, El Hamidi, Tligui .B, M. Lyoussi and Hassar. *Annales pharmaceutiques françaises.* 2002,123-129in *Lebanese Science Journal, Vol. 14, No. 1, 2013.*

Lausanne, Suisse, 1999 in mémoire de master Université des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie Larbi Tébessi – Tébessa

Lev. N, Gilgun-Sherki, Y. Offen, D. Melamed, E.Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders, 1st ed, *Elsevier BV*, Amsterdam, 2007, pp283-295 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie Ferhat Abbas – Sétif.

li H.B, Cheng .K.W, Wong .C.C, Chen, Jiang ,Y. *Food Chemistry.*, 2007, pp771-776in mémoire de master Université des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie Larbi Tébessi – Tébessa

Locatelli .M, Travaglia. F, Coisson. M, F, Martelli.A .J.D, Stevigny.A,Arlorio. A, C.M *Food Chemistry.*, 2010, pp1647-1655 in mémoire de magister Université des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie Larbi Tébessi – Tébessa

M

Macheix .J, Fleuriet .F, Jay-Allemand .C. *PPUR presses polytechniques.*, 2005,134 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra.

Macheix. J.J, Fleuriet .A. Billot, Fruit phenolics, CRC press, Boca Roton, Paris,1990

Magalhães. L, Segundo. M, Reis .S, Lima Jose .L.F.C. *Analytica chimica acta* ., 2008, [67]1–19.in memoire de magister Université d’Oran Es-Sénia

Mak .S.Y, Tse. I.T,Dickens .B.F, *Biochemical Pharmacology.*, 1991,459-464/157 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif),2012.

Mann .C.M, Cox S.D, Markham. J.L. *Letters in Applied Microbiology.*, 2000, pp294, 297 in mémoire de master Université des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie Larbi Tébessi – Tébessa

Masquelier. J. Flavay, for a healthy mind body, 2006 in Université des Sciences de la Nature et de la Vie, Constantine

Mohammedi, Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l’Algérie, 2013, P 845600 *in memoire de master université* des Sciences de la Nature et de la Vie, ouargla

Molyneux. P, *Songklanakarinn. J, Sci. Technol.*2004,211-219 *in Revue de génie industriel* **2009**, 4, 25-39

Morena .M , Martin-Mateo. M J,Cristol.P, Canaud. B ,*Néphrologie.* , 2002,201-208.

Mourad. B, mémoire de magister, Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif), 2011

N

Nauciel C., J.L. Vildé, Bactériologie médicale, 2èmeEd. Masson, Paris 2005

Nawel. B, mémoire de magister Université DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L’UNIVERS – KASDI MERBAH- (Ouargla) ,2012.

Newman. D.J., Cragg .G.M., Snader .K.M. *J. Nat. Prod.*, 2003,1022-1037 *in thèse de doctorat* UNIVERSITE DE CORSE-PASQUALE PAOLI.

Nicholls . P, *Archives of Biochemistry and Biophysics*,2012,95-101 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra

Nicolas. M, Daniel. C, *Activités technologiques en microbiologie – techniques de base et méthodologie*, Editeurs CRDP, Bordeaux, 1998, pp152 in mémoire de master Université des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie Larbi Tébéssi – Tébéssa

OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ; 2002. Diabète sucré. Aide mémoire ; N°138.

Ozanda. P, *Flore et végétation du Sahara*, 3ème édition , Ed CNRS, Paris,1991,pp 662 in mémoire de master Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*

Ozanda. P, *Journal of Ethnopharmacology.*, 2006, 358–367 in mémoire de master Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*.

Ozenda. P, *Flore du Sahara*, Ed du CNRS, 1977,pp, 312-322 in mémoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-Sétif, 2012.

P

Parasitologie technique de base pour le laboratoire. Bibliothèque de l'OMS, 1997 in mémoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-Sétif, 2012

Perry. J, Staley .J, Lory .S, *Microbiologie*. Cours et question de révision, 2002, 159-160 in mémoire de master Université Larbi Tébéssi- Tébéssa.

Pham-Huy. L.A, He .H, Pham-Huy .C. *International Journal of Biomédical Médecine.*, 2008,89-96 in mémoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-Sétif, 2012 *Lebanese Science Journal, Vol. 14, No. 1, 2013*.

Pincemail .J, Degrune .F, Voussure. S, Malherbe. C, Paquot .N, Defraigne .J.O. *Nutrition clinique et métabolisme*. 2007,66-75 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra

Piquet. M.A, X. Hébuterne, *Nutrition en pathologie digestive*, *Wolters Kluwer ed, France*, 2007, pp 93. in thèse de doctorat Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*

Pokorny. J, Yanishlieva .N, Gordon .M.H.N, Wood head Publishing Limited., 2001,108,109
Université d'Oran Es-Sénia

Prior. R. L, Wu. X, Schaich .K, *Journal of Agricultural and Food Chemistr*., 2005,4290-4302
inthèse de doctorat Université des Antilles et de la Guyane

Q

Quezel.P, Santa. S, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales,
Editions du CNRS, paris,1962-1963,pp475,476.in memoire de magister Université des
Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-Sétif, 2012

R

Radia .R., mémoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie Mentouri de
Constantine,2006.

Rice-Evans .C.A, Bolwell P.G, Bramley P.M, Pridham .J.B. *Free Radical Research*., 1995,
22, 375-383in *Revue de génie industriel* 2009, 4, 25-39

Robert .D, Catesson .A.M.A, Biologie végétale : caractéristiques et stratégie évolutives des
plantes. Organisation végétative, *Wolters Kluwer Edition Volume2, France*, 2000, pp320

S

S. Kalam , R. Singh, A. Mani, J. Patel, K.F. Naem, A. Pandey. elixir of life1., 2012, 18-34 in
memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie Ferhat Abbas – Sétif.

SHAHIDI .F, Natural Antioxydants: Chemistry, Heath affects and applications AOCS
MISSION STATEMENT Ed,1997,p p 174-197in memoire de magister *UNIVERSITE* des
sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *ABOU BEKR
BELKAID TLEMCEN*

Sharaf .M., Ansari. M..A, Maltin .S.A, Saleh .N.A, *Phytochemistry*., 1997, 44,533-536 in
memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-Sétif,
2012.

Singh.S.B,Barrett.J.F,*Biochem.Pharmacol.*,2006, 1006-1015 in these de doctorat
UNIVERSITE DE CORSE-PASQUALE PAOLI

Smith. M. A, Perry. G, Richey .P, LSayre. L. M, Anderson .V. E,Beal. M. F, *Chem.*, 1996, 11, 1135– 1146. In thèse de doctorat Université *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*.

Stocker. Yamamoto .Y, McDonagh. A. F, Glazer .A. N, Ames. B. N.. *Science* .,1987, 1043-1046.in thèse de doctorat Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*.

Suhaj. M.. A review. *J. Food Compos. And Analys.*, 2006,531-537 in article *ISSN : 2028-2508*

T

Tabuti. Lye, Dhillion. *Ethnopharmacology*.,2003,19,in *memoire de master université des Sciences de la Nature et de la Vie,ouargla*

Tahrouch.A, Rapior.S, Mondolot-Cosson .L ,Idrissi-Hassani. L.A. Bessière. J.M. Andary .C *Reviews in biology and biotechnology by the Moroccan society of biology in Canada.*, 2002,2,33,37 in *memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie - Ferhat Abbes-Sétif,2012.*

Trease .G.E, Evans .W.C, *A tex book of Pharmacognosy*, 13th edition, Bacilluere Tinal Ltd, London, 1989in thèse de doctorat Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*

U

UMR CNRS 6134 SPE, France,2011. In mémoire de master Université des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie Larbi Télessi – Télessa UNUP, *Food and Press nutrition bulletin.*, 1986, in Université des Sciences de la Nature et de la Vie ,Constantine

Ursinum, *Pro Quest Edition.*, 2007 in *memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif),2012.*

V

Vârban .D.I, Duda .M, Vârban .R, Muntean .S. *UASVM Agriculture*. 2009, 225-229 in article *ISSN: 2028-2508*

Virot.S,*Thèse de doctorat*, Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers Claude Bernard(Lyon1),2004 in thèse de doctorat Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*

Visioli .F, Borsani, Galli .C,. *Cardiovascular Research.*, 2000,419-425 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra-

W

Waksmundzka-Hajnos.M, Sherma. J, Photochemical ience. *Chromatographic Science Series.* 2011,477,478.

Walker. J.E.M, Saraste .M.J, Gay .N.J. *Embo J.*, 1982, 51,945 in ithèse de doctorat Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.*

Webographie

Wolters Kluwer, ed, France, 2008, p 20.in in thèse de doctorat Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers *Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*

Wu .H, Isolation and characterization of natural products from inger and Allium Ursinum, *Pro Quest Edition*, 2007, pp 28. In memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif), 2012

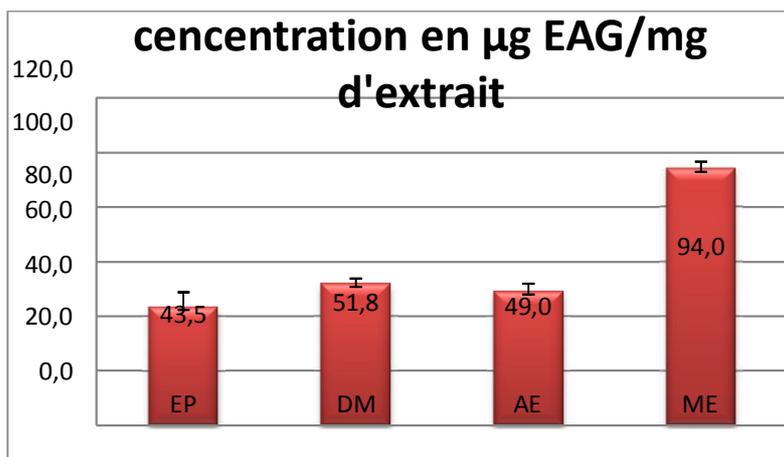
Wu D, Cederbaum .A, *Alchol Research and Healt.*2003, 277-284 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie Ferhat Abbas – Sétif.

Yoshimoto.M. H. Sakamoto, N. Yoshimoto, R. Kuboi, K. Nakao, *Enzyme and Microbial Technology*,2007,849-858 in thèse de doctorat Université des Sciences exactes, des sciences de la nature et de vie Mohamed Khider – Biskra

Yousefi. R., Ghaffarifar. F, Dalimi. A.A, *Iranian Journal of Parasitology.*,2009, 40-47in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif),2012

Z

Zharekeev .B, Khashimov .K, Telezhenetskaya M, Yunusov S. *Chemistry of Natural Compounds.*, 1974, pp282, 283 in memoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-(Sétif),2012



Annexe 01 : Diagramme représentatif du Teneur des polyphénols totaux (en µg EAG/mg d'extrait) de *Peganum harmala*

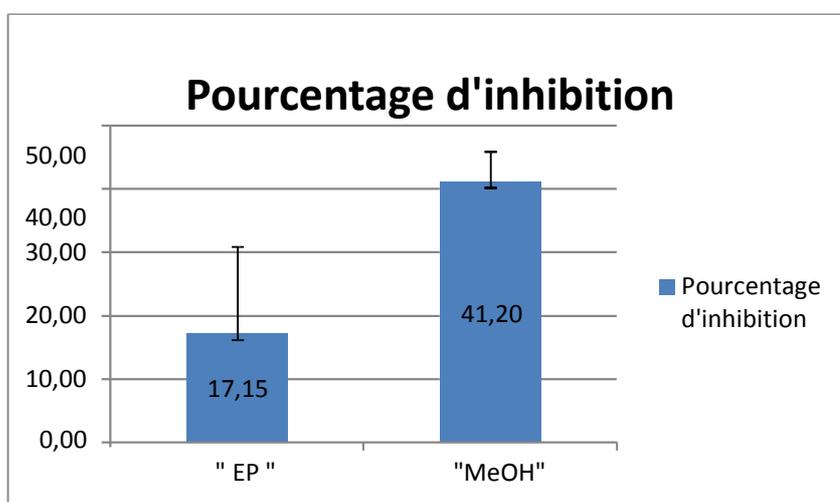
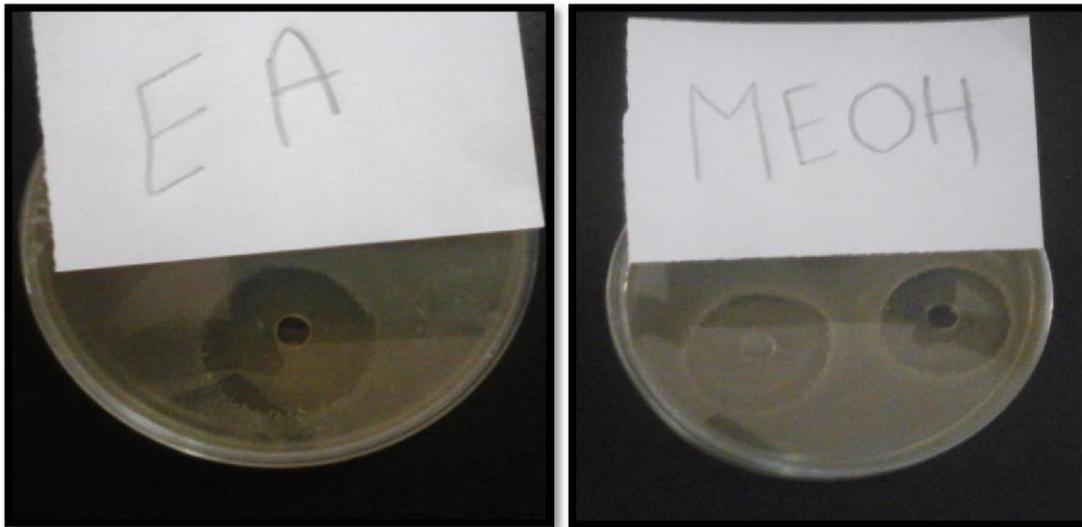


Figure 02 : Histogramme représentatif du pourcentage d'inhibition des extraits méthanolique et éther de pétrole de *Peganum harmala*.

Annexe 03 : Détermination du diamètre de la zone d'inhibition (mm) de deux extraits de *Peganum Harmala*.

Bactéries d'étude	Acétate d'éthyle	Méthanol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	Après 5 jours	
	2,44 ± 0,38	2,68 ± 0,13



Annexe 04 : Effet inhibiteur de quatre extraits de *Peganum Harmala* sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Annexe 05 : Coloration de Gram

➤ **Préparation et fixation du frottis microbien**

Un ensemencement d'une colonie de la souche à analyser est fait par une goutte d'eau Physiologique stérile sur une lame de verre propre. Le frottis obtenu est séché à proximité de La flamme d'un bec Bunsen, puis fixé par des passages rapides de la lame sur la même Flamme.

➤ **Coloration de gram**

La pureté des bactéries d'étude a été confirmée par la coloration de Gram.

La coloration de Gram a été réalisée selon le protocole suivant :

- ✓ Préparer un frotti.
- ✓ Recouvrir le frotti avec de violet de Gentiane et laisser agir 1 mn puis rincer à l'eau distillée.
- ✓ Verser du Lugol et laisser agir pendant 1 mn.
- ✓ Décolorer à l'alcool à 95° entre 15 et 30 seconds puis rincés à l'eau distillée.
- ✓ Fixer avec de la fuchsine pendant 10 à 30 secondes et rincer à l'eau distillée et sécher audessus de la flamme d'un bec Bensen.
- ✓ Observer au microscope optique à l'objectif (x 100) avec huile à immersion.

Les Gram + se colorent en violet tandis que les Gram - apparaissent colorés en rose.

Annexe 06 : Préparation de la solution du DPPH

La concentration de cette solution est de 0,037mg/ml, préparée à partir de 9,30 mg solubilisé dans 250ml du méthanol absolu.

- ✓ La solution se mise dans un flaquant fumé, bien fermé. Puis elle est mélangée pendant deux heures.
- ✓ Le flaquant est conservé au froid et à l'obscurité.

Annexe 07 : Préparation de bouillon nutritif

5g de bouillon nutritif \longrightarrow 1 litre d'eau distillé stérile

- ✓ On fait le pesage de poudre de bouillon nutritif. Puis verser dans un Arlène stérile

Contient l'eau distillée stérile.

- ✓ On mélange le contenu par un agitateur pendant 10 minutes.
- ✓ On pose chaque milieu dans un flacon stérile puis, on fait l'autoclavage pendant 30 minutes.

Annexe 08 : Reactif de Mayer

- Chlorure de mercure..... 1,36 g
- Iodure de potassium..... 5 g
- Eau distillé..... 100 ml