

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي

معسكر

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, génie microbiologique et sécurité sanitaire

THESE de DOCTORAT

Spécialité Valorisation des substances naturelles

Intitulée

**Etude phytochimique et activité antimicrobienne a
des huiles essentielles des feuilles de *Peganum
harmala* du sud algérien.**

Présentée par : Mr Ghillace Abderrahmane

Le 20/11/2025

Devant le jury :

Président	MEDDAH Boumediene	Pr	Université de Mascara
Examinateur	BENDAHA Mohamed	M.C.A	Université de Mascara
Examinateur	LABBACI fatima zohra	M.C.A	Université de Mascara
Examinateur	KAHLOULA Khaled	Pr	Université de Saida
Examinateur	ADLI Djallal Eddine Houari	M.C.A	Université de Saida
Encadreur	CHOUITAH Ourida	Pr	Université de Mascara

Année Universitaire : 2024-2025

Remerciements

Mes remerciements les plus sincères, les plus continus s'adressent à ALLAH qui m'a donné la force, le courage et la patience lors de la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier, tout d'abord, mon directeur de la thèse CHOUTAH O, Professeur à l'Université de Mascara, pour son encadrement, ses conseils et pour la confiance qu'elle m'a témoignée.

Je remercie très vivement Monsieur MEDDAH B Professeur à l'Université de Mascara, pour l'honneur qu'il me fait pour avoir accepté la présidence du jury.

Je remercie Monsieur BENDAHA M Maitre de conférence A à l'Université de Mascara, d'avoir accepté de porter un jugement à mon travail scientifique et pour son aide. Je vous exprime ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont aussi à Madame LABBACI FZ Maitre de conférence A à l'Université de Mascara, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de faire partie de jury.

Je remercie également Monsieur KAHLOULA K Professeur à l'Université de Saïda, pour sa participation au jury et lui demande d'accepter toute ma reconnaissance et qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à Monsieur ADLI D.H Maitre de conférence A à l'Université de Saïda, d'avoir accepté de juger ce modeste travail. Qu'il soit assuré de ma respectueuse et très sincère gratitude.

J'exprime ma reconnaissance à Mademoiselle KIARI F et Messieur RIGHI K de l'université de Mascara qui m'ont aidé pendant mon travail de thèse et l'ensemble des enseignants qui ont contribué efficacement tout long de cette formation.

Je remercie également les chefs et les ingénieurs et l'ensemble du personnel du laboratoire pédagogique et du laboratoire de recherche de la faculté de Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Mustapha Stambouli. Mascara.

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

Dédicace

Je dédie ce modeste travail aux personnes qui me sont les plus chères, mes parons, je ne savais jamais comment exprimer mes sentiments pour leur sacrifice, tendresse et affection qu'ils ont toujours accomplis avec dévouement pour me permettre de réussir dans ma vie, Vous m'avez donné toute l'attention et tout l'amour qu'un être puisse espérer. Merci pour vos instructions, votre soutien, aucun de mes mots ne saurait exprimer l'ampleur de ma reconnaissance.

A ma petite famille ma femme Amani et mon fils Anes et ma fille Ines

A mes sœurs : Amina, Nadia, Soumia, Bedra.

A mon beaux frère : Abdelaziz, Mokhtar, Zoubir, Amine.

A tous ceux qui me sont chers et à tous mes amis.

Résumé

Les plantes médicinales ont une large utilisation dans la médecine traditionnelle. L'objectif de notre étude est de valoriser les plantes médicinales et aromatiques de la flore algérienne. Pour cette raison, nous avons déterminé la composition phytochimique et l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Peganum harmala* dans deux régions différentes du sud Algérien. Les huiles essentielles des feuilles de *Peganum harmala* collectées dans deux régions différentes (Bougtob et Mechria) a été analysée par GC-MS. Les résultats ont révélé la présence de 55 et 47 composés avec un rendement de 0,217 % et 0,211 %. Ces huiles essentielles ne contiennent pas les mêmes composants majeurs pour la région de Bougtob : Carvone 21,15 %, Phytol 17,41 %, Acide carbamique 3,52 %, Acide laurique 2,10 %, Thymol 1,77 % et Tétrapentacontane 1,32%. Pour la région de Mechria, Phytol 10,24%, Carvone 5,92%, Tétrapentacontane 2,80%, Phytone 2,18%, Hydroxytoluène butylé 1,48%, Acide laurique 1,39%. Les huiles essentielles qui ont été testées ont montré des degrés variables d'activité antimicrobienne. En général, les bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus cereus* ATCC 11778) et les champignons (*Candida albicans* ATCC 30031, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404) se sont révélés plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram-négatives (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922).

Docking moléculaire représente les molécules principales responsables de ces effets antimicrobiens : Carvone, Phytol, Thymol, Dihydroactinidiolide et 2-aminobenzaldehyde. Cependant, l'activité antimicrobienne enregistrée confirme certains des usages traditionnels de la plante dans le traitement de certaines maladies.

Mots clés : *Peganum harmala*, Les feuilles, Les huiles essentielles, GC-MS, Activité antimicrobienne, sud Algérien.

Abstract :

Medicinal plants have a wide range of uses in traditional medicine. The objective of our study is to enhance the value of medicinal and aromatic plants in the Algerian flora. For this reason, we determined the phytochemical composition and antimicrobial activity of *Peganum harmala* essential oil in two different regions of southern Algeria. The essential oils from the leaves of *Peganum harmala* collected in two different regions (Bougtob and Mechria) were analyzed by GC-MS. The results revealed the presence of 55 and 47 compounds with yields of 0.217% and 0.211%. These essential oils do not contain the same major components for the Bougtob region : Carvone 21.15%, Phytol 17.41%, Carbamic acid 3.52%, Lauric acid 2.10%, Thymol 1.77%, and Tetracontane 1.32%. For the Mechria region, Phytol 10.24%, Carvone 5.92%, Tetracontane 2.80%, Phytone 2.18%, Butylated Hydroxy Toluene 1.48%, Lauric Acid 1.39%. The essential oils that were tested showed varying degrees of antimicrobial activity. In general, Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus cereus* ATCC 11778) and fungi (*Candida albicans* ATCC 30031, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404) were found to be more sensitive to essential oils than Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922).

Molecular Docking represents the main molecules responsible for these antimicrobial effects : Carvone, Phytol, Thymol, Dihydroactinidiolide, and 2-aminobenzaldehyde. However, the recorded antimicrobial activity confirms some of the traditional uses of the plant in the treatment of certain diseases.

Key words : *Peganum harmala*, Leaves, Essential oils, GC-MS, Antimicrobial activity, Southern Algeria.

الملخص

تُستخدم النباتات الطبية بشكل واسع في الطب التقليدي. هدف دراستنا هو إحياء النباتات الطبية والعلمية من الفلورا الجزائرية. لهذا السبب، قمنا بتحديد التركيب الكيميائي النباتي والنشاط المضاد للميكروبات لزيت *Peganum harmala* الأساسي في منطقتين مختلفتين من جنوب الجزائر. تم تحليل الزيوت الأساسية لأوراق *Peganum harmala* التي تم جمعها من منطقتين مختلفتين (بوقطب ومشيرية) باستخدام تقنية GC-MS. أظهرت النتائج وجود 47 مركبًا مع عائد بنسبة 0.211% و 0.217%. هذه الزيوت الأساسية لا تحتوي على نفس المكونات الرئيسية لمنطقة بوغتوب: كارفون 15%， فيتول 17,41%， حمض الكارباميك 3,52%， حمض اللوريك 10%， ثيمول 1,77% و تيترا بنتاكونتان 1,32%. بالنسبة لمنطقة مشيرية، فيتول 10.24%， كارفون 5.92%， تترابنتاكونتان 2.80%， فيتون 2.18%， هيدروكسي التولوين بيوتيل 1.48%， حمض اللوريك 1.39%. أظهرت الزيوت الأساسية التي تم اختبارها درجات متفاوتة من النشاط المضاد للميكروبات. بشكل عام، تبين أن البكتيريا إيجابية الجرام (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus cereus* ATCC 11778) ، كانت والفطريات (*Candida albicans* ATCC 30031, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404)، أكثر حساسية للزيوت الأساسية من البكتيريا سالبة الجرام (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603، *Escherichia coli* ATCC 25922)

يمثل الالتحام الجزيئي الجزيئات الرئيسية المسئولة عن هذه التأثيرات المضادة للميكروبات: كارفون، فيتول، ثيمول، ديهيدروأكتينيديوليد، و 2-أمينوبنزالدهيد. ومع ذلك، فإن النشاط المضاد للميكروبات المسجل يؤكد بعض الاستخدامات التقليدية للنبات في علاج بعض الأمراض.

الكلمات المفتاحية: *Peganum harmala*، الأوراق، الزيوت الأساسية، GC-MS، النشاط المضاد للميكروبات، جنوب الجزائر

Liste des tableaux

Tableau 01	La classification taxonomique de <i>Peganum harmala</i>	05
Tableau 02	Répartition géographique de <i>Peganum harmala</i>	06
Tableau 03	Température et pressions critiques de quelques fluides	24
Tableau 04	Classement des composants des huiles essentielles	41
Tableau 05	Différents types de molécules dans l'huile essentielle	43
Tableau 06	Classement des terpènes	45
Tableau 07	Les caractéristiques géographiques et bioclimatiques des sites de récolte	66
Tableau 08	Les microorganismes utilisés pour évaluer l'activité antimicrobienne des H.E.	78
Tableau 09	Tableau de lecture de la galerie API 20 E.	81
Tableau 10	Tableau de lecture de la galerie API Staph.	82
Tableau 11	Aspects des huiles essentielles de <i>P.harmala</i> .	97
Tableau 12	Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du <i>P.harmala</i> .	98
Tableau 13	Composants phytochimiques identifiés dans l'huile essentielle de <i>P. harmala</i> (région de Bougtob) par GC-MS.	106
Tableau 14	Composants phytochimiques identifiés dans l'huile essentielle de <i>P. harmala</i> (région de Mechria) par GC-MS.	108
Tableau 15	Noms, codes, résolution R-free des différentes protéines utilisées et les dimensions de la boîte de chaque site actif.	137

Tableau 16	Score de liaison (kcal/mol) et constante d'inhibition (μM) des principales molécules présentes dans l'huile essentielle de <i>Peganum harmala</i> avec différentes protéines pour l'activité antibactérienne.	138
Tableau 17	Résultats de l'amarrage moléculaire de l'ampicilline standard et les principaux composés de l'HE de <i>Peganum harmala</i> contre la gyrase de l'ADN d' <i>E.coli</i> et de <i>S.aureus</i> .	147
Tableau 18	Les trois meilleurs composés dockés de l'HE de <i>Peganum harmala</i> avec l'ampicilline standard contre la gyrase d'ADN d' <i>E.coli</i> (PDB : 3G7E) et de <i>S.aureus</i> (PDB : 3G75).	148

Liste des figures

Figure 01	Les fleurs et feuilles de la plante <i>Peganum harmala</i>	04
Figure 02	Les fruits et les graines de la plante <i>Peganum harmala</i>	05
Figure 03	Montage d'extraction par Hydrodistillation type Clevenger	15
Figure 04	Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau	17
Figure 05	Montage d'extraction par hydrodiffusion	18
Figure 06	Presse hydraulique pour la méthode d'expression à froid	19
Figure 07	Les différents types d'extraction par solvants volatils	20
Figure 08	Technique d'extraction par les corps gras	21
Figure 09	Extraction assisté par micro-ondes	22
Figure 10	Schéma du dispositif d'extraction d'huile essentielle par CO ₂ supercritique	25
Figure 11	Méthodes d'analyse d'un mélange complexe	26
Figure 12	Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du ¹³ C	37
Figure 13	Schéma représentant les principaux constituants des HEs	42
Figure 14	Formule de l'isoprène	44
Figure 15	Exemples de Structure chimique de terpènes	46
Figure 16	Structures de quelques Monoterpènes acycliques	48
Figure 17	Structures de quelques Monoterpènes monocycliques	48
Figure 18	Structure de quelques Monoterpènes bicycliques	49
Figure 19	Structure de quelques sesquiterpènes	50
Figure 20	Exemples de la structure chimique de composés aromatiques	52

Figure 21	Voies responsables de la synthèse de terpènes et phenylpropenes, les principaux métabolites présents dans les huiles essentielles des plantes	56
Figure 22	Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne	58
Figure 23	Plan général de la partie expérimentale	62
Figure 24	Les feuilles de <i>Peganum harmala</i> L.	64
Figure 25	Carte géographique représentant les sites de récolte de <i>P.harmala</i>	65
Figure 26	Montage de clevenger	67
Figure 27	Réfractomètre d'Abbe	70
Figure 28	Polarimètre de Laurent	71
Figure 29	Chromatographie phase gazeuse couplée avec spectre de masse	76
Figure 30	Galerie API 20 E	80
Figure 31	Galerie API Staph	80
Figure 32	Protocole expérimentale pour la préparation des concentrations en huiles essentielles par dilutions binaires	84
Figure 33	Méthode de présentation de l'inoculum microbien	85
Figure 34	Principe de la méthode de la diffusion sur disque	87
Figure 35	Technique de diffusion sur gélose par la technique des disques	89
Figure 36	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).	93
Figure 37	Illustration de la méthode du remplissage de la microplaqué.	94
Figure 38	Le rendement en huile essentielle de <i>P.harmala</i> a été obtenu par hydro-distillation pour différentes régions	101
Figure 39	Profils chromatographiques en phase gazeuse des principaux constituants des huiles essentielles de <i>Peganum harmala</i> pour la région de Bougto.	104

Figure 40	Profils chromatographiques en phase gazeuse des principaux constituants des huiles essentielles de <i>Peganum harmala</i> pour la région de Mechria.	105
Figure 41	Les constituants majeurs de huile essentielles de <i>P.harmala</i> de la région du Bougtnob par GC-MS	111
Figure 42	Spectre de masse du composant Carvone de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i>	112
Figure 43	Spectre de masse du composant Phytol de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i> .	113
Figure 44	Spectre de masse du composant Acide carbamique de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i>	114
Figure 45	Spectre de masse du composant Acide laurique de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i> .	115
Figure 46	Spectre de masse du composant Thymol de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i> .	116
Figure 47	Spectre de masse du composant 2-Aminobenzaldehyde de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i> .	117
Figure 48	Spectre de masse du composant Dihydroactinidiolide de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i> .	118
Figure 49	Les constituants majeurs des huiles essentielles de <i>P.harmala</i> de la région du Mechria par GC-MS	119
Figure 50	Spectre de masse du composant Tétrapentacontane de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i> .	120
Figure 51	Spectre de masse du composant Phytone de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i> .	121
Figure 52	Spectre de masse du composant Hydroxytoluène butylé de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i> .	122

Figure 53	Spectre de masse du composant Hexatriacontane de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i> .	123
Figure 54	Spectre de masse du composant 3,5-di-tert-Butyl-4 hydroxybenzaldehyde de l'huile essentielle des feuilles de <i>P.harmala</i> ..	124
Figure 55	Zones d'inhibition de la croissance (mm) utilisant la technique de contact direct dans un milieu gélosé pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>P.harmala</i> .	130
Figure 56	CMI ($\mu\text{g/ml}$) utilisant la méthode de microdilution dans 96 plaques microlitres multiparois montrant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>P.harmala</i> .	131
Figure 57	Comparaison du diamètre de la zone d'inhibition et de la CMI pour les bactéries/champignons individuels pour la région de Mechria.	132
Figure 58	Comparaison du diamètre de la zone d'inhibition et de la CMI pour les bactéries/champignons individuels pour la région de Bougtob.	133
Figure 59	Diagramme d'interaction récepteur-ligand 2D pour les principales molécules de <i>P.harmala</i> via <i>Staphylococcus aureus</i>	142
Figure 60	Diagramme d'interaction récepteur-ligand 2D pour les principales molécules de <i>P.harmala</i> via <i>Bacillus cereus</i>	143
Figure 61	Diagramme d'interaction récepteur-ligand 2D pour les principales molécules de <i>P.harmala</i> via <i>Klebsiella pneumoniae</i>	144
Figure 62	Diagramme d'interaction récepteur-ligand 2D pour les principales molécules de <i>P.harmala</i> via <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	145
Figure 63	Diagramme d'interaction récepteur-ligand 2D pour les principales molécules de <i>P.harmala</i> via <i>Escherichia coli</i>	146

Figure 64 Diagramme d'interaction en 2D et 3D des trois composés les mieux classés de HEs de *P.harmala* et de l'ampicilline standard contre la gyrase d'ADN d'*E. coli* (PDB ID : 3G7E). 149

Figure 65 Diagramme d'interaction en 2D et 3D des trois composés les mieux classés des HEs de *P.harmala* et de l'ampicilline standard contre la gyrase d'ADN de *S. aureus* (PDB ID : 3G75). 150

Figure 66 Interaction 2D carvone et phytol de l'huile essentielle de *Peganum harmala* contre *Candida albicans*. 155

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

AFNOR : Association Française de normalisation

ATCC: American Type Culture Collection

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxide

DO : Densité Optique

g : Gramme

GC-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse

h : Heure

HE : Huile(s) essentielle(s)

IA : Indice d'acide

IB : Inoculum Bactérien

IR : Indice de réfraction

ISO : International Organisation for Standardisation

mg : Milligramme

MH : Mueller Hinton

min : Minutes

mm : Millimètre

N : Normalité

Nist : National Institute of Standards and Technology

nm : Nanomètre

OMS: Organisation Mondial de santé

pH : Potentiel hydrogénique

Ppm : Partie par million

R : Rendement

SM : Solution Mère

tR : temps de Rétention

UFC : Unité formant colonie

V : Volume

µl : microlitre

Table des matières

Résumé

Abstract

الملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Table des matières

Introduction générale	01
------------------------------	-----------

Partie bibliographie

Chapitre I *Peganum harmala*

I.1. Présentation de la plante <i>Peganum harmala</i>	03
I.1.1 Généralités	03
I.1.2. Noms vernaculaires	03
I.1.3. Description botaniques	03
I.1.4. Classification	05
I.1.5. Répartition géographique	06
I.1.6. Utilisation traditionnelle	06
I.1.7. Utilisation pharmacologiques	07
I.1.7.1. Usage externe	07
I.1.7.2. Usage interne	08
I.1.7.3. Effets cardiovasculaires	08
I.1.7.4. Effets sur le système nerveux	09

I.1.7.5. Effets antibactérien, antifongique, insecticide et antiparasitaire	10
I.1.7.6. Effets anticancéreux et antioxydants	10
I.1.7.7. Effets sur le système immunitaire	10
I.1.7.8. Effets antidiabétiques	10
I.1.8. Métabolite secondaire	11
I.1.8.1. Les alcaloïdes	11
I.1.8.2. Les bêta-carbolines (β carbolines)	12
I.1.8.3. Les composés phénoliques	12
I.1.8.4. Les flavonoïdes	12
I.1.8.5. Les terpènes ou terpénoïdes	13
I.1.8.6. Anthraquinones	13

Chapitre II Techniques d'extractions des huiles essentielles

II.1. Techniques d'extraction des huiles essentielles	14
II.1.1. Distillation	14
II.1.2. L'hydrodistillation	14
II.1.3. L'entraînement à la vapeur d'eau	16
II.1.4. La distillation à vapeur saturée	17
II.1.5. Hydro-diffusion	17
II.1.6. L'expression à froid	18
II.1.7. Extraction par solvants	19
II.1.8. Extraction par les corps gras	21
II.1.9. Extraction par micro-ondes	22
II.1.10. Extraction par les gaz supercritiques	23
II.1.11. L'extraction par enfleurage	25
II.2. Identification et analyse des constituants dans un mélange complexe	25
II.2.1. Analyse par des couplages « en ligne » : Voie A	27
II.2.1.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)	27

III.2.1.1. Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique	28
II.2.1.1.1. Les couplages CPG-SM, CPG-SM(ICP) et CPG-SM(ICN)	28
II.2.1.1.2. Les couplages CPG-IRTF et CPG-IRTF-SM	30
II.2.1.1.3. Le couplage CLHP-SM et CLHP-SM-SM	30
II.2.1.1.4. Le couplage CLHP-CPG-SM	31
II.2.1.1.5. Le couplage CLHP-RMN ¹ H	31
II.2.1.1.6. Le couplage CLHP-RMN ¹ H-SM	32
II.2.2. Identification des constituants après purification : Voie B	32
II.2.3. Analyse par RMN du ¹³ C sans séparation préalable : Voie C	33
II.2.3.1. Intérêt de la RMN du ¹³ C	34
II.2.3.2. Identification des constituants en mélange par RMN du ¹³ C	35
II.2.3.3. Observation des signaux	35
II.2.4. Méthode d'analyse développée au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse	36
II.2.4.1. Principe de la méthode	36

Chapitre III Activités biologique des huiles essentielles

III. Les huiles essentielles	40
III.1. Activité antibactérienne	40
III.2. Composition chimique des huiles essentielles	40
III.2.1. Terpènes	44
III.2.1.1. Hemiterpènes	47
III.2.1.2. Monoterpènes	47
III.2.1.3. Sesquiterpènes	49
III.2.1.4. Les diterpènes	50
III.2.2. Composés aromatiques	50
III.2.3. Composés d'origines diverses	53
III.3. Les propriétés des huiles essentielles	53

III.4. Les chémotypes	54
III.5. Biosynthèse des huiles essentielles	54
III.5.1. Voie des Terpenoïdes	54
III.5.2. Voie des Phenylpropanoïdes	55
III.6. Mécanisme d'action antimicrobienne des H.Es	57

Partie expérimentale

Chapitre I Matériels et méthodes

I. Description	61
I.1. Matériel végétale et extraction des huiles essentielles	63
I.1.1 Matériels végétale	63
I.1.2. Matériels microbiologique	66
I.2. Extraction des huiles essentielles	66
I.3. Caractérisation d'huile essentielle de <i>Peganum harmala</i>	68
I.3.1. Caractères sensorielles et indices physicochimiques	68
I.3.2. Caractéristiques sensorielles	68
I.3.3. Indice physic-chimique d'huile essentielle étudiée	68
I.3.3.1. Propriétés physiques	68
I.3.3.2. Mesure du pH	68
I.3.3.3. La densité relative	68
I.3.3.4. L'indice de réfraction	69
I.3.3.5. Le pouvoir rotatoire	71
I.3.3.6. La miscibilité à l'éthanol	72
I.3.3.7. Le point de congélation	72
I.3.4. Propriétés chimiques	73
I.3.4.1. Détermination de l'indice d'acide	73
I.3.4.2. Indice d'ester	74
I.4. Analyse des huiles essentielles par chromatographie phase gazeuse CPG	74

I.4.1. Conditions opératoire	74
I.4.2. Identification des constituants	75
I.4.3. Spectrométrie de masse SM	75
I.5. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des feuilles <i>Peganum harmala</i>	77
I.5.1. Vérification de la pureté des bactéries et identification des souches	78
I.5.1.1. Identification des bactéries	78
I.5.1.2. Préparation des précultures	83
I.5.1.3. Préparation des concentrations des huiles essentielles	83
I.5.2. Méthodologie des tests antibactériens	86
I.5.2.1. Méthode de Diffusion en milieu solide ou aromatobiogramme	86
I.5.2.2. Méthode de microdilution en milieu liquide	90
I.5.3. Études de docking moléculaire des huiles essentielles de <i>Peganum harmala</i>	95
I.5.3.1. Simulations de docking moléculaire	95

Chapitre II Résultats et discussion

II.1. Aspects des huiles essentielles de <i>P.harmala</i> pour les deux régions	97
II.2. Propriétés sensorielles et indices physicochimiques	97
II.2.1. Le pH	98
II.2.2. La densité	98
II.2.3. Indice de réfraction	99
II.2.4. Indice d'acide	99
II.2.5. Indice d'ester	99
II.2.6. La miscibilité à l'éthanol	100
II.2.7. Le point de congélation	100
II.3. Rendement d'extraction	101
II.4. Composition chimique des huiles essentielles	102
II.5. Activité antibactérienne	127

II.6. Analyse computationnelle de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Peganum harmala</i> (Molecular Docking)	135
II.6.1. Simulations de docking moléculaire	135
Conclusion	156
Références bibliographique	158
Annexe	169

Introduction générale

Des données récentes émanant du secteur pharmaceutique démontrent que, pour le traitement de plusieurs maladies complexes, les plantes médicinales constituent une ressource très précieuse pour le développement de nouveaux produits chimiques. En effet, elles sont encore utilisées dans les zones rurales des pays en développement (**Hosseinzadeh et al., 2015**). Elles constituent souvent la seule forme de traitement du cancer pour de nombreuses personnes en Afrique du Nord (**Savadi et al., 2020**). De fait, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé que 80% de la population mondiale dépend des plantes pour le traitement primaire (**OMS, 2000**).

Les plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes, qui constituent les huiles essentielles connus pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans les milieux populaires médecine depuis longtemps (**Samarth et al., 2017**). Essentiel les huiles sont des substances naturelles complexes avec des propriétés bien définies caractéristiques physico-chimiques et répondant à des critères de qualité qu'il faut connaître pour éviter tout risque de toxicité, ce qui peut s'avérer dangereux pour la santé car certains sont essentiels les huiles et les plantes médicinales sont très dangereuses (**Haddouchi et al., 2008**) à l'exception de celles de certaines plantes médicinales.

De plus, ces produits présentent une grande variabilité dans leur constituants chimiques, leur donnant de nombreux médicaments et propriétés biologiques qui doivent être connues et valorisées (**Rashid et al., 2010**).

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse avec plusieurs espèces de plantes qui présentent divers intérêts et qui constituent des axes de recherches scientifiques et surtout dans le domaine des substances naturelles (**Haraoui et al., 2019**). Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours des dernières années. La flore algérienne comprend 3300 espèces (**Quezel & Santa, 1963**).

Certaines espèces font l'objet de nombreuses recherches scientifiques depuis plusieurs décennies, et d'autres sont peu étudiées ou se limitent à une partie seulement d'entre elles. C'est le cas de *Peganum harmala* L.

La première partie est une synthèse bibliographique comportant trois chapitres :

- Le premier une présentation sur la plante *Peganum harmala* botanique et thérapeutique.
- Le deuxième chapitre comportant les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles.
- Enfin le dernier chapitre sur l'activité biologique des huiles essentielles comme agent antimicrobien et leurs applications thérapeutiques.

La deuxième partie est l'expérimentation où on développe l'échantillonnage, extraction des huiles essentielles par et la caractérisation chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons aussi abordé, l'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.

La dernière partie est une discussion des résultats obtenue qui sera achevé par une conclusion.

*Etude
bibliographique*

Chapitre I

Peganum harmala

I.1. Présentation de la plante *Peganum harmala*

I.1.1 Généralités

Peganum harmala L., plante de la famille des *Zygophyllaceae*, les plantes appartenant à cette famille, sont très reconnaissables à l'aspect de ses herbes, arbustes, ou arbres. Dans la classification de **Sheahan et Chase, (1996)** constituent une famille avec environ 285 espèces, qui se subdivisent en cinq sous-familles et 27 genres. Elles sont largement distribuées dans les régions arides, semi-arides, les terrains salés, et les pâturages désertiques (**Tahrouch et al., 1998** ; **Asgarpanah et Ramezanloo, 2012**). Le genre *Peganum* tient son nom du grec et est attribué aux espèces de la rue, alors que le nom de l'espèce *harmala* dérive de celui de la ville Libanaise Hermel (**Mars, 2009**).

I.1.2. 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.1.3. Description botaniques

Plante herbacée vivace, à tiges ordinairement peu rameuses, de 30 à 90 cm de haut, à entre nœuds assez courts, densément feuillés.

- **Les tiges** dressées, très rameuses, qui disparaissent à l'hiver, portent des feuilles alternes, découpées en lanières étroites. A leur extrémité, s'épanouissent les fleurs solitaires, assez grandes (25 à 30 mm) (**Figure1**).
- **Les feuilles** : sont allongées et irrégulièrement divisées en multiples lanières très fines pouvant atteindre 5x5 cm. Les feuilles supérieures ne dépassent pas 1,5 mm de largeur (**Figure1**).

- **Les fleurs** : La plante présente des fleurs assez grandes (25 à 30 mm), d'un blanc-jaunâtre veinées de vert avec cinq sépales inégaux persistants qui dépassent la corolle et des pétales crème lavés de rose-orangé à nervures jaunes, oblongs et subsymétriques (**Figure1**). Elles sont monoïques dotées de dix à quinze étamines à anthères longues de 8 mm à filets très élargis et plat dans leur partie inférieure, et à gynécée de 8-9 mm de longueur; des ovaires globuleux de trois à quatre loges et des stigmates à 3 carènes insensiblement atténués en style (**Chopra et al., 1960** ; **Maire, 1933**; **Ozanda, 1991**).



Figure 1. Les fleurs et feuilles de la plante *Peganum harmala*.

- **Les fruits** sont des petites capsules sphériques avec trois chambres de 6 à 10 millimètres de diamètre qui se tient droit sur sa tige et déprimées au sommet. (**Yousefi et al., 2009**). Les capsules contiennent plus de 50 petites graines triangulaires (**Asghari et al, 2004** ; **Moloudizargari et al., 2013**) (**Figure 2**).
- **Les graines** nombreuses, petites, anguleuses, subtriangulaires, de couleur marron foncé, dont le tégument externe est réticulé, ont une saveur amère (**Figure2**) (**Chopra et al., 1960**).



Figure 2. Les fruits et les graines de la plante *Peganum harmala* (Weckesser, 2013).

✚ **La racine** est oblongue, dure et garnie de fibres. Elle peut atteindre plus de 3m de profondeur (Quézel et Santa, 1963). De nouvelles pousses peuvent se développer à partir des racines latérales (Roche, 1991 ; Parsons et Cuthbertson, 1992).

I.1.4. Classification

Selon OUARED, 2008, *Peganum harmala LINNE, 1753* est classé dans le règne végétal comme il est montré dans le tableau 01 :

Tableau 1. La classification taxonomique de *Peganum harmala* (Ozenda., 1991).

<i>Peganum harmala</i> L.	
Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Sapindales
Famille	Zygophylaceae
Genre	<i>Peganum</i>
Espèce	<i>Peganum harmala linne, 1753</i>

I.1.5. Répartition géographique

Cette plante est largement distribuée à travers le monde. Elle est particulièrement répandue dans les zones arides et sèches méditerranéennes dans les sols sableux et légèrement nitrés (Iserin, 2001).

Tableau 2. Répartition géographique de *Peganum harmala* (Hammiche et al., 2013)

Continents	Répartition géographique
En Europe	les zones sèches, de l'Espagne à la Hongrie jusqu'aux steppes de la Russie méridionale
En Asie	Les steppes de l'Iran et du Turkestan jusqu'au Tibet
En Afrique	les zones arides méditerranéennes du Moyen-Orient au Nord de l'Afrique (Tunisie, Sahara septentrional et central en altitude, Hauts-Plateaux algériens et Oriane, Maroc oriental)
En Algérie	<i>Peganum harmala</i> L 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 (Ozenda, 1991).

I.1.6. Utilisation traditionnelle

La plante présente un intérêt en médecine traditionnelle où les graines sont depuis longtemps utilisées : elles sont narcotiques, antihelminthiques, antispasmodiques et utilisées dans certains cas contre les rhumatismes et l'asthme (Siddiqui et al., 1988 ; Bellakhdar, 1997).

La plante est proverbiale dans la médecine traditionnelle depuis les périodes les plus courtes comme remède pour un éventail de plaintes (**Shi et al., 2000**). Un colorant rouge obtenu à partir de ses graines est largement répandu en Turquie et en Iran pour la coloration des tapis (**Baytop, 1999**). L'harmal a été traditionnellement employé pour traiter le diabète dans la médecine folklorique de quelques régions du monde (**Bnouham et al., 2002**). *Peganum harmala* a été employé par certaines population pour traiter certains désordres de système nerveux tels que la maladie de Parkinson (**Leporatti, 2009**), en conditions psychiatriques comme la nervosité (**González et al., 2010**).

En médecine traditionnelle du Nord d'Afrique, harmel est une véritable panacée réputée traité la plupart des troubles. Quelques « recettes » recueillies au Maghreb pour illustrer cette diversité d'emplois, sont rapportées (**Hammiche et al., 2013**).

- Suc de plante fraîche : en liniment à base de graisse de mouton, contre les douleurs articulaires.
- Cataplasmes de feuilles hachées, appliquées *in situ* et maintenues par un foulard, contre les rhumatismes, les céphalées, la fièvre, la toux et les affections pulmonaires, les morsures de serpents ; appliques sur la plante des pieds comme emménagogue et abortif.
- Fumigations à base de plante sèche ou de graines pour le tétanos néonatal, les rhumatismes, les affections génitales féminines, les maladies mentales et nerveuses, les insomnies de l'adulte et de l'enfant (**Hammiche et al., 2013**).

I.1.7. Utilisation pharmacologiques

I.1.7.1. Usage externe

La plante fraîche soit hachée et employée en cataplasmes, soit après extraction du suc pour la composition d'un liniment à base de graisse de mouton, ou bien utilisé la plante sèche ou les graines sous forme de fumigations. Les huiles des graines obtenues par décoction des graines dans l'huile d'olive sont très efficaces. La plante séchée, ou bien

les graines, pulvérisée et tamisée pour donner la poudre de l'"Harmel et aussi la décoction de racines (**Boufek, 1982**).

I.1.7.2. Usage interne

Des graines une cuillère à café, soit environ 2,5 g, avalées telles quelles avec un verre d'eau ou mélangées au miel ou pilées avec de l'huile d'olive, plante fraîche hachée et bouillie dans l'huile, ou bien les feuilles sèches en décoction (**Boufek, 1982**).

I.1.7.3. Effets cardiovasculaires

Est l'une des plantes médicinales les plus utilisées pour traiter l'hypertension et les maladies cardiaques dans le monde entier. Des expériences *in vivo* ont montré que différents extraits de *Peganum harmala* où ses principaux alcaloïdes actifs, harmine, harmaline, harman et harmalol, ont des effets cardiovasculaires différents, tels que la bradycardie, la diminution de la pression artérielle, le débit aortique de pointe et la force contractile cardiaque et vasodilatatrice (**Aarons et al., 1977**) et des effets inhibiteurs antigéniques (**Hamsa et Kuttan ,2010**).

- ***Vasodilatatrices et effets antihypertenseurs***

L'extrait aqueux des graines de *Peganum harmala* est antispasmodique, anticholinergique, antihistaminique et a des effets anti-adrénergiques (**Aqel et Hadidi, 1991**). Une étude sur les effets cardiovasculaires de harmine, harmaline et harmalol a indiqué que ces trois alcaloïdes ont des effets vasorelaxants (**Shi et al., 2001**). Dans la même étude, l'activité vasorelaxante de harman, un autre alcaloïde actif de *Peganum harmala*, a été montré avec un mécanisme d'interaction avec le type L canaux Ca^{2+} et l'augmentation de la libération de NO à partir des cellules endothéliales de façon dépendant de la présence externe de Ca^{2+} . Ces effets peuvent être impliquée dans son activité hypotensive. Il a été montré que harmaline, harmine et harmalol en diminuant aussi la pression artérielle systémique (**Shi et al., 2000**).

- ***Effets sur le cœur***

Il y a eu quelques études menées sur les effets directs de l'extrait de *Peganum harmala* et ses alcaloïdes sur le muscle cardiaque. Dans une étude, il a été montré que les alcaloïdes isolés (harmine, harmaline et harmalol) ont également diminué l'effet et la fréquence cardiaque normale chez des chiens anesthésiés (**Aarons et al., 1977**).

- ***Effet inhibiteur angiogénique***

Il a été révélé dans une étude que l'harmine est un inhibiteur angiogénique puissant. Cette substance peut réduire considérablement la prolifération des cellules endothéliales vasculaires et l'expression de différents facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance endothérial vasculaire, NO et les cytokines pro-inflammatoires. En outre, l'harmine diminue la production des cellules tumorales par d'autres facteurs, qui jouent un rôle important dans l'angiogénèse comme la cyclooxygénase (COX-2) (**Hamsa et Kuttan, 2010**).

- ***Effet inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire***

Les alcaloïdes de *Peganum harmala* ont également semblé avoir des effets antiagrégants plaquettaires (**Saeed et al., 1991**).

I.1.7.4. Effets sur le système nerveux

Diverses études *in vitro* et *in vivo* ont indiqué une large gamme d'effets produits par des alcaloïdes de *Peganum harmala* à la fois sur le système nerveux central et périphérique y compris, l'analgésie, l'hallucination, excitation et l'effet antidépresseur (**Moloudizargari et al., 2013**). En outre, il a été prouvé que les β carbolines de *Peganum harmala* interagissent avec la dopamine, GABA, 5-hydroxytryptamine, benzodiazépine, et imidazoline au niveau de leurs récepteurs présents dans le système nerveux et de cette façon induisant leurs nombreux effets pharmacologiques (**Moloudizargari et al., 2013**).

I.1.7.5. Effets antibactérien, antifongique, insecticide et antiparasitaire

Diverses études ont montré différents effets pharmacologiques comme antiparasitaires (**Akhtar et al. ,2000; Astulla et al, 2008**), antifongiques, antibactériennes (**Saadabi, 2006 ; Nenaah, 2010**) et insecticides (**Rharrabe et al. ,2007**) des alcaloïdes dérivés des graines de *Peganum harmala*

I.1.7.6. Effets anticancéreux et antioxydants

Depuis longtemps, diverses préparations de *Peganum harmala* ont été utilisées dans le traitement de cancers et des tumeurs. En effet, des études *in vitro* ont mis en évidence la diminution de viabilité cellulaire de cellules cancéreuses provenant de divers tissus incluant le cerveau, le colon, le sein, le poumon, le foie, l'œsophage et les tissus gastriques, après un traitement par l'harmine. Plusieurs chercheurs ont montré la cytotoxicité de différents extraits de *Peganum harmala* sur des lignées cellulaires tumorales *in vitro* et *in vivo* (**Chen et al. ,2005**).

De nombreuses études pharmacologiques suggèrent un effet antioxydant de *Peganum harmala* (**Hamden et al., 2009**).

I.1.7.7. Effets sur le système immunitaire

Les β Carbolines de *Peganum harmala* sont montrés des effets immunomodulateurs dans plusieurs études (**Wang et al., 1996 ; Farzin et Mansouri, 2006**). Des extraits de cette plante ont un effet anti-inflammatoire significatif via l'inhibition de certains médiateurs de l'inflammation prostaglandine.

I.1.7.8. Effets antidiabétiques

Harmine est le principal alcaloïde de *Peganum harmala* qui est impliqué dans l'effet antidiabétique. Une étude a montré que ce composé régule l'expression du récepteur Peroxysomes Gamma Proliferator-Activated (PPAR γ), le principal régulateur de l'adipogénèse et la cible moléculaire des médicaments antidiabétiques, par inhibition de la voie de signalisation (**Waki et al., 2007**).

Des études récentes ont indiqué clairement que l'extrait éthanolique des graines de harmel, réduit significativement le taux de glucose sanguin chez des rats normaux et diabétiques à des doses variables (150 et 250 mg/kg). Cependant, il a été rapporté que l'extrait de harmel n'a aucune activité sur la sécrétion d'insuline, puisque cette activité hypoglycémique est liée au pancréas. En effet, il affecte l'utilisation et/ou l'absorption du glucose (**Jinous et Fereshteh, 2012**).

I.1.8. Métabolite secondaire

Des études phytochimiques réalisées sur la plante *Peganum harmala* ont permis d'isoler plusieurs types de composés chimiques tels que les alcaloïdes, stéroïdes, flavonoïdes, anthraquinones, acides aminés et les polysaccharides à partir des graines, feuilles, fleurs, tiges et des racines (**Hua et al ., 2013**).

I.1.8.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Ils sont synthétisés à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane (**Bhat et al., 2005**). Quelques structures sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes.

L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Il existe cependant un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur. Dans ces cas-là, l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par réactions d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones (**Hesse, 2002**).

La plupart de ces alcaloïdes sont des alcaloïdes indoliques simples à **β carbolines** tels que, harmine, harmaline, harmalol, harmol, harman, tetrahydroharmine et harmalididine et des alcaloïdes **Quinazolines** comme : Peganine (vasicine), vasicinone (**Mahmoudian et al., 2002 ; Lamchouri et al., 2013**) et déoxyvasicinone.

I.1.8.2. Les bêta-carbolines (β carbolines)

L'harmaline, l'harmine, l'harmalol, l'harmol et le tétrahydroharmine sont identifiés et quantifiés comme étant les principaux alcaloïdes bêta-carbolines de *Peganum harmala*.

Les graines et les racines contiennent un taux plus élevé des alcaloïdes avec un taux faible dans les tiges et les feuilles, et sont absent dans les fleurs. L'harmine et l'harmaline s'accumulent dans les graines sèches à 4,3 et 5,6%, respectivement, d'harmalol à 0,6% et de tétrahydroharmine à 0,1%. Les racines contiennent l'harmine et l'harmol avec 2 et 1,4% respectivement (Herraiz *et al.*, 2010).

I.1.8.3. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires (Lebham, 2005). L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre) (Bruneton, 1993).

Les composés phénoliques sont des molécules hydrosolubles présentes dans tous les végétaux. Ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes). Certains d'entre eux sont responsables d'amertume et d'astringence (Adrian et Frangne, 1991 ; Milane, 2004).

I.1.8.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (Tapas *et al.*, 2008).

Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes (Sadasivam et Thayumanavan, 2003).

I.1.8.5. Les terpènes ou terpénoïdes

Du point de vue structural, les terpènes constituent une grande famille de composés préologues, c'est-à-dire d'homologues à enchaînement isoprénique. Le terme de terpénoïdes est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale (Malecky, 2005). Jusqu'à présent, dix triterpénoïdes ont été identifiés à partir du genre *Peganum*. Quatre triterpénoïdes : l'ester méthylique de l'acide 3, 27-dihydroxyl-20 (29) -en-28-oïque, ester méthylique de l'acide 3 -acétoxy-27-hydroxylup-20 (29) -en-28-oïque et acide 3 -acétoxyolean-12-ène-27,28-dioïque 28-méthylester ont été isolés de l'extrait éthanolique des racines de *Peganum nigellastrum* (Ma et al., 2007).

I.1.8.6. Anthraquinones

Une étude réalisée sur les graines de *Peganum harmala* a permis d'isoler trois anthraquinones, la peganone I, la peganone II et l'anthraquinone glucoside. Les structures ont été déterminées par comparaison de leurs RMN, SM, données physiques avec ceux décrits dans les littératures (Fan et Yao, 1992, Li, 2005).

Chapitre II

Techniques

d'extractions des

huiles essentielles

II.1. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Plusieurs méthodes ont été développées pour l'extraction des huiles essentielles. On peut citer : l'entraînement à la vapeur d'eau, l'expression à froid, l'enfleurage, l'extraction par fluide supercritique, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par microondes, etc. Le choix de la méthode la mieux adaptée à l'extraction des arômes d'un végétal se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait, de manière à pouvoir minimiser les distorsions inévitables entre l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction (**Boukhatem et al., 2019**).

La durée de la distillation peut être ramenée de quelques minutes jusqu'à 30 heures, on d'avantage, suivant les paramètres intervenant au cours du procédé.

Avant d'aborder chacune des méthodes, il est intéressant de procéder à l'étude des paramètres régissant les mécanismes d'extraction des huiles essentielles (**Pollien, 1998**).

II.1.1. Distillation

La plupart des huiles essentielles sont obtenues par distillation et entraînement à la vapeur d'eau, à l'exception des huiles essentielles d'hespérédés (citron, oranges) et l'huile de cade .On admet que la vapeur pénètre dans les tissus de la plante et vaporise toutes les substances volatiles ; isolement des essences de la plante démontrant donc uniquement une quantité suffisante de vapeur.

La distillation par entraînement à la vapeur d'eau par divers procédés physiques et chimiques.

II.1.2. L'hydrodistillation

Le principe de l'hydrodistillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la matière première végétale directement dans un appareil de type Clevenger ou dans un alambic rempli au trois quarts d'eau, puis l'ensemble est porté à ébullition à la pression atmosphérique. Les vapeurs détruisent la

structure des cellules végétales, libèrent les molécules contenues dans ces cellules et entraînent les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité, l'huile essentielle surnageant généralement au-dessus de l'hydrolat. Cette méthode est la plus simple, la plus répandue et la moins couteuse. Cependant, en dépit de sa simplicité, elle peut apporter de nombreux artefacts.

En effet, l'eau, l'acidité et la température du milieu peuvent induire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, de racémisation, d'oxydation, d'isomérisation, etc.. (Figueredo, 2007)

En outre, certains organes végétaux notamment les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas le traitement par hydrodistillation (Farhat, 2010).

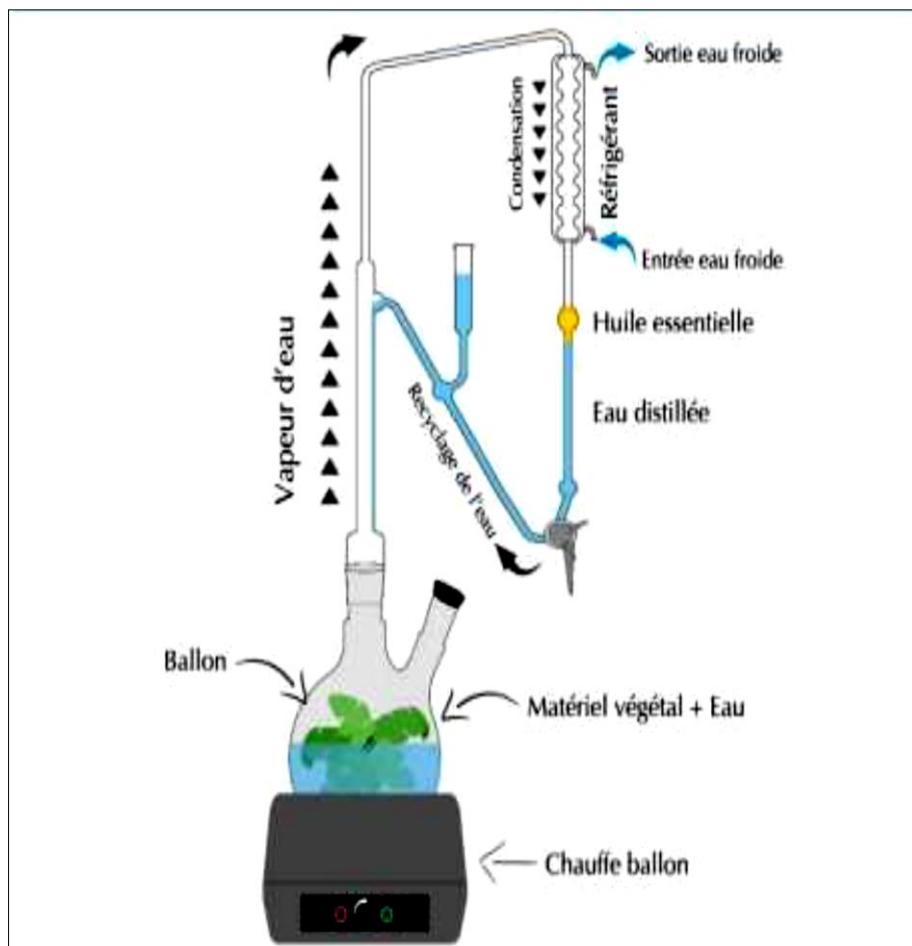


Figure 03. Montage d'extraction par Hydrodistillation type Clevenger (Figueredo, 2007).

II.1.3. L'entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour obtenir des huiles essentielles (**Pharmacologie Européenne, 2007**). Elle est basée sur le fait que les constituants des huiles essentielles sont volatils, ont une température d'ébullition basse donc entraînable par la vapeur d'eau et du fait de leur caractère hydrophobe, ils sont donc séparables de l'eau. Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans le vase d'entraînement, l'huile essentielle contenue dans la plante est chauffée, disloquée du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation. En fonction de la densité de l'huile essentielle, elle peut être au-dessus du distillat ou en dessous (**Afnor, 2000**). En fonction de sa densité, elle peut être recueillie à deux niveaux :

- niveau supérieur du distillat, si elle est plus légère que l'eau, ce qui est fréquent.
- niveau inférieur, si elle est plus dense que l'eau.

Les principales variantes de l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont l'hydro distillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydro diffusion (**Teuscher et al., 2005**).

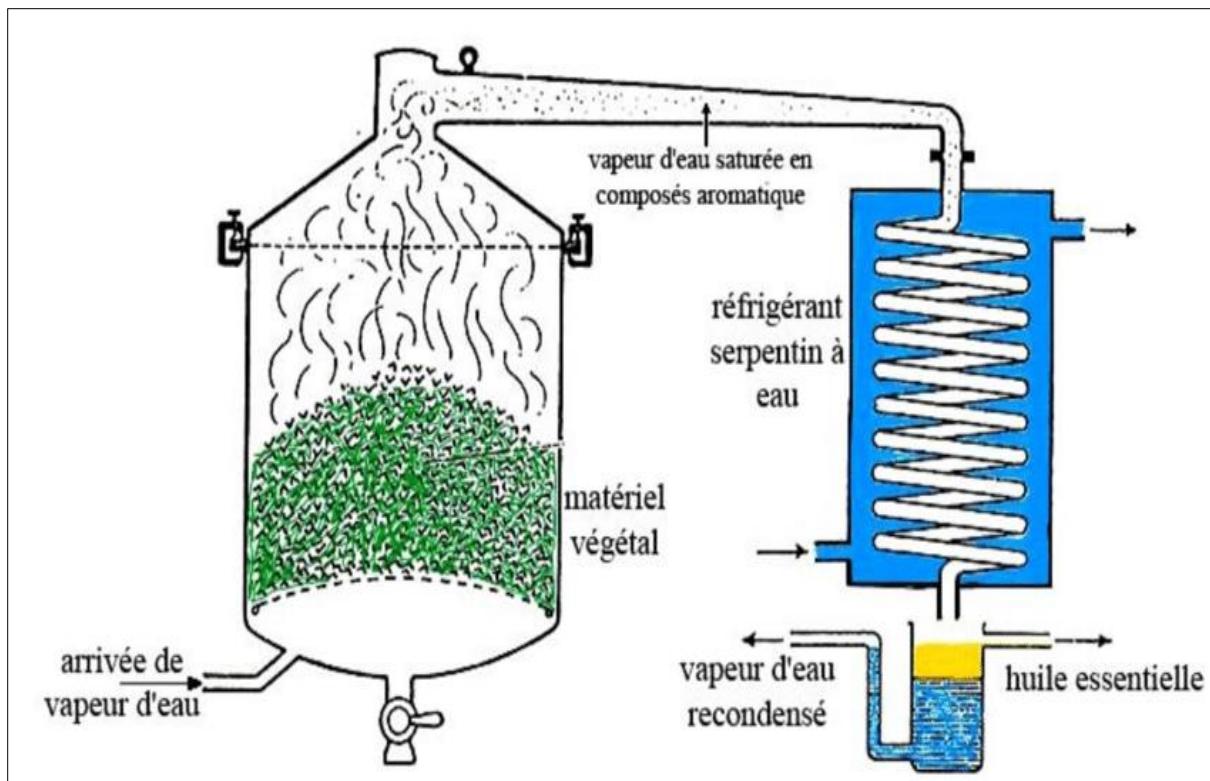


Figure 04. Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (Garnero, 1996).

II.1.4. La distillation à vapeur saturée

Dans cette variante, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La distillation à vapeur saturée est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques ou médicinales. En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique ou à son voisinage et à 100°C, température d'ébullition de l'eau. Son avantage est que les altérations de l'huile essentielle recueillie sont minimisées (Wichtl et Anton, 2003).

Pour certaines productions (lavande, menthe), on utilise des alambics mobiles qui sont en fait des bennes de récolte conçues pour être intercalées par l'agriculteur lui-même, après remplissage, dans un montage de distillation (Bruneton, 2008).

II.1.5. Hydro-diffusion

Dans cette méthode, le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau. La technique consiste à pulser de la vapeur d'eau du haut vers le bas à travers la matière végétale

sous pression réduite. La vapeur d'eau emporte avec elle toutes les substances volatiles. L'huile essentielle est recueillie grâce à un collecteur qui permet un équilibre avec la pression atmosphérique.

L'avantage de cette méthode est de permettre un gain de temps et d'énergie. Elle permet également d'éviter un grand nombre d'artéfacts liés à une température élevée et permet l'obtention d'un meilleur rendement en huile essentielle (AFSSAPS, 2008).

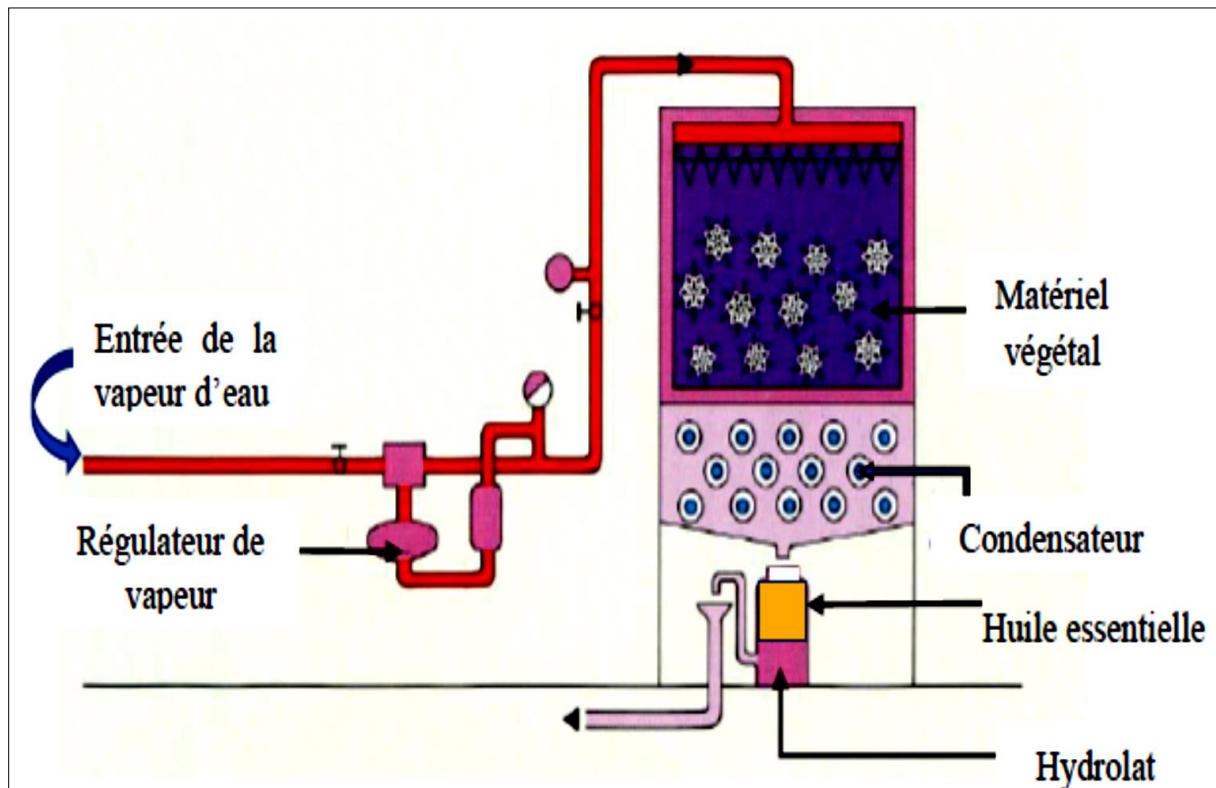


Figure 05. Montage d'extraction par hydrodiffusion (Dugo et Di Giacomo, 2002).

II.1.6. L'expression à froid

L'extraction par expression à froid, est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine, etc. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (Chaintreau *et al.*, 2003).



Figure 06. Presse hydraulique pour la méthode d'expression à froid (**Chaintreau et al., 2003**).

II.1.7. Extraction par solvants

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque de sélectivité de ce fait de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure (**Shellie et al., 2004**).

Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques. Le

Pouvoir du solvant à l'égard des constituants odorants (la stabilité, inertie chimique, température d'ébullition) pour permettre son élimination totale, pas trop faible pour éviter les pertes et donc une élévation des couts, sécurité de manipulation.

Les solvants les plus utilisés sous réserve de législations restrictives particulières. Ce sont les hydrocarbures aliphatiques : éther de pétrole, hexane, propane ou butane liquides, après l'extraction le solvant est distillé en fin de l'opération.

Si l'utilisation de solvants à bas point d'ébullition évite les dégradations induites par la présence d'eau et par les pH acides. Diverses modifications ne demeurent néanmoins possibles avec des solvants comme l'acétone ou comme les alcools quoique dans ce dernier cas des traces d'éthers éthyliques ne sont pas toujours nuisibles aux qualités olfactives du produit final.

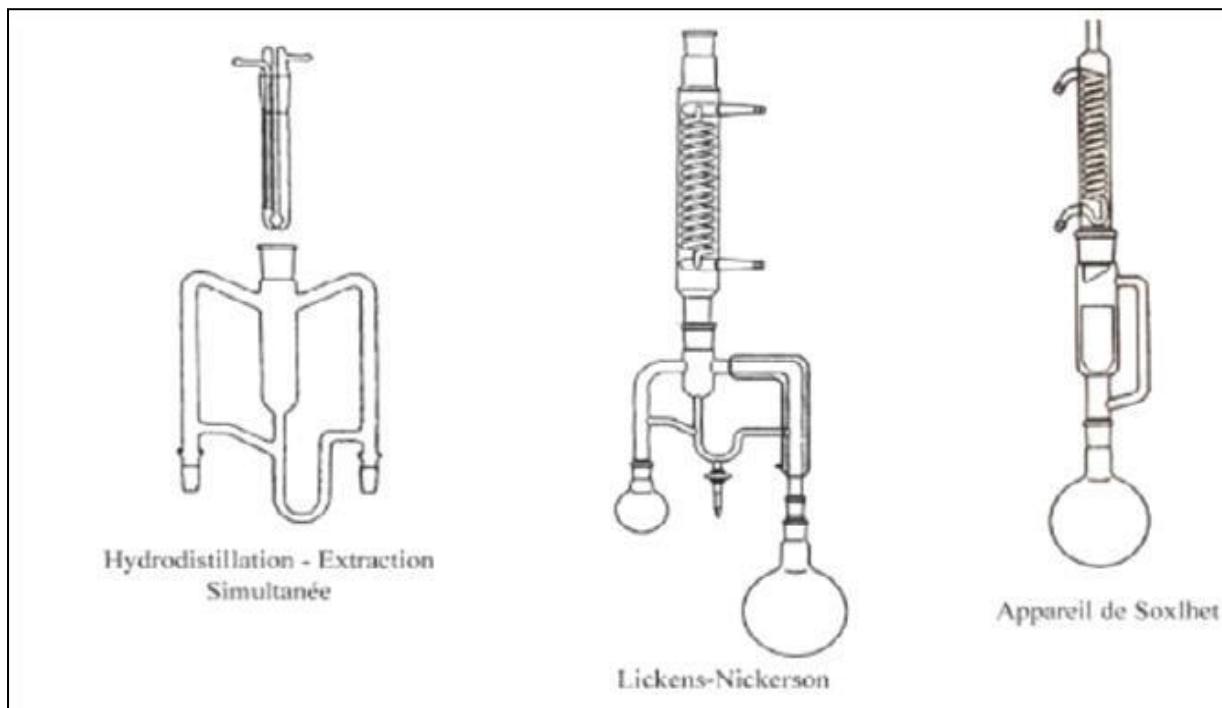


Figure 07. Les différents types d'extraction par solvants volatils (Shellie *et al.*, 2004).

II.1.8. Extraction par les corps gras

La méthode d'extraction par les corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en essence végétale. Le produit obtenu est une pommade florale qui est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite. Dans cette technique, on peut distinguer l'enfleurage où la saturation se fait par diffusion à la température ambiante des arômes vers le corps gras et la digestion qui se pratique à chaud, par immersion des organes végétaux dans le corps gras (Cordero *et al.*, 2007).



Figure 08. Technique d'extraction par les corps gras (Cordero *et al.*, 2007).

II.1.9. Extraction par micro-ondes

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelé : Vacuum Microwave Hydro distillation (VMHD), consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences.

Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats (**Koubaa et al., 2016**).

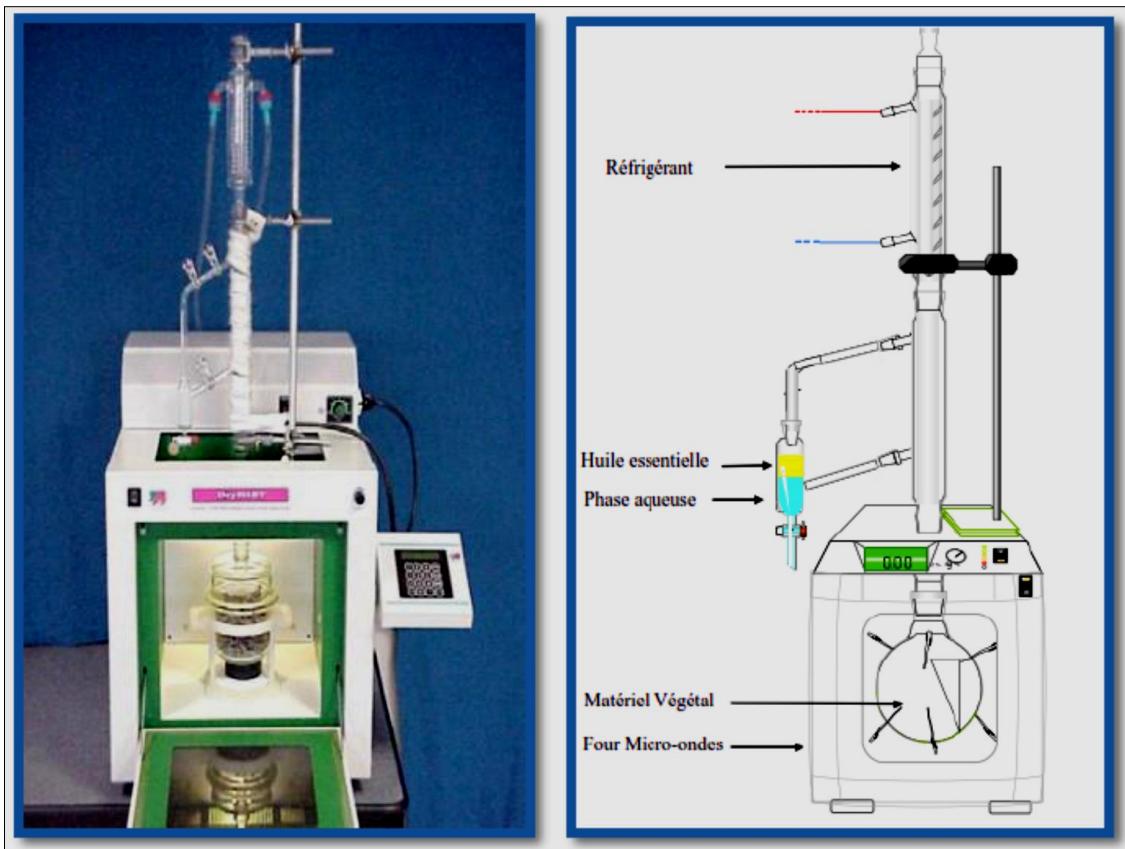


Figure 09. Extraction assisté par micro-ondes (**Koubaa et al., 2016**).

II.1.10. Extraction par les gaz supercritiques

Au-delà du point critique, un fluide peut avoir la densité d'un liquide et la viscosité d'un gaz ,d'où une bonne difusibilité dans les solides et un bon pouvoir solvant .Si plusieurs gaz peuvent en théorie être utilisés, l'intérêt s'est porté initialement sur le dioxyde de carbone, ce qui s'explique si l'on considère ses atouts: produit naturel, inerte chimiquement, ininflammable, strictement atoxique, facile à éliminer totalement, sélectif, aisément disponible, peu réactif chimiquement et peu couteux. Si les contraintes technologiques sont loin d'être négligeables (point critique se situe à $P = 73.8$ bars et $T= 31.1^{\circ}\text{C}$) les avantages sont nombreux : capacité à fournir des extraits de composition très proche de celle des produits naturels, possibilité de faire varier la sélectivité, la viscosité en jouant sur la température et la pression, absence d'hydrolyse et de réarrangements (**Bruneston, 2008**).

Le dioxyde de carbone refroidi et comprimé à une pression inférieure à la pression critique passe à l'état liquide. Il est comprimé puis chauffé à une pression et température fixées selon la nature de l'extrait voulu (huiles essentielles et oléorésine) le fluide traverse ensuite la cuve d'extraction où se trouve le matériel végétal, le CO_2 supercritique chargé en solutés est ensuite étendu au-dessous de la pression critique avant d'entrer dans le séparateur et passer à l'état gazeux. Il perd ainsi ses propriétés de solvant et permet aux solutés de précipiter et d'être récupérées le CO_2 peut être alors recyclé ou éliminé. Cette technique assure l'obtention d'extrait non hydrolysés, oxydés ou estérifiés et du fait que la température critique du CO_2 est 37°C , les risques de dégradation thermique sont éliminés. La pression critique est facilement atteinte dans une opération de production (**Reverchon ,1997**).

Cette technique n'est pas facilement recommandée pour le matériel végétal donnant un produit à faible valeur ou avec un rendement faible (**Benjilali et al., 2004**).

Avec le procédé il est possible d'effectuer une extraction sélective de Produit chimiques. Il est important de préciser que ce procédé est le seul procédé connu qui permet la migration de composantes désirées hors de leur matrice .ceci résulte de l'application de l'énergie de façon sélective à l'intérieur de la matrice; les procédés

conventionnels d'hydrodistillation d'extraction par solvant chaud, soxhlet ...etc. sont fondés sur un mécanisme commun soit le transfert aléatoire d'énergie au contenant et à l'entourage de la matrice. Les rendements et la qualité de l'huile essentielle obtenue suite à l'extraction par micro-ondes se sont souvent avérés supérieurs à ceux des méthodes conventionnelles. La stabilité des extraits produits par le procédé assisté par micro-ondes était également supérieure à tous les extraits obtenus par les autres méthodes (**Benjilali et al., 2004**).

Tableau 03. Température et pressions critiques de quelques fluides (**Bruneston, 2008**).

Fluide	Température critique (°C)	Pression critique (bar)
Dioxyde de carbone (CO ₂)	31.1	73.8
Eau (H ₂ O)	374	220
R134a (C ₂ H ₂ F ₄)	101	101.6
Ethane (C ₂ H ₆)	32.2	48.8
Propane (C ₃ H ₈)	96.6	42.5
Ethylène (C ₂ H ₄)	9.5	50.76
Propylène (C ₃ H ₆)	91	46.1

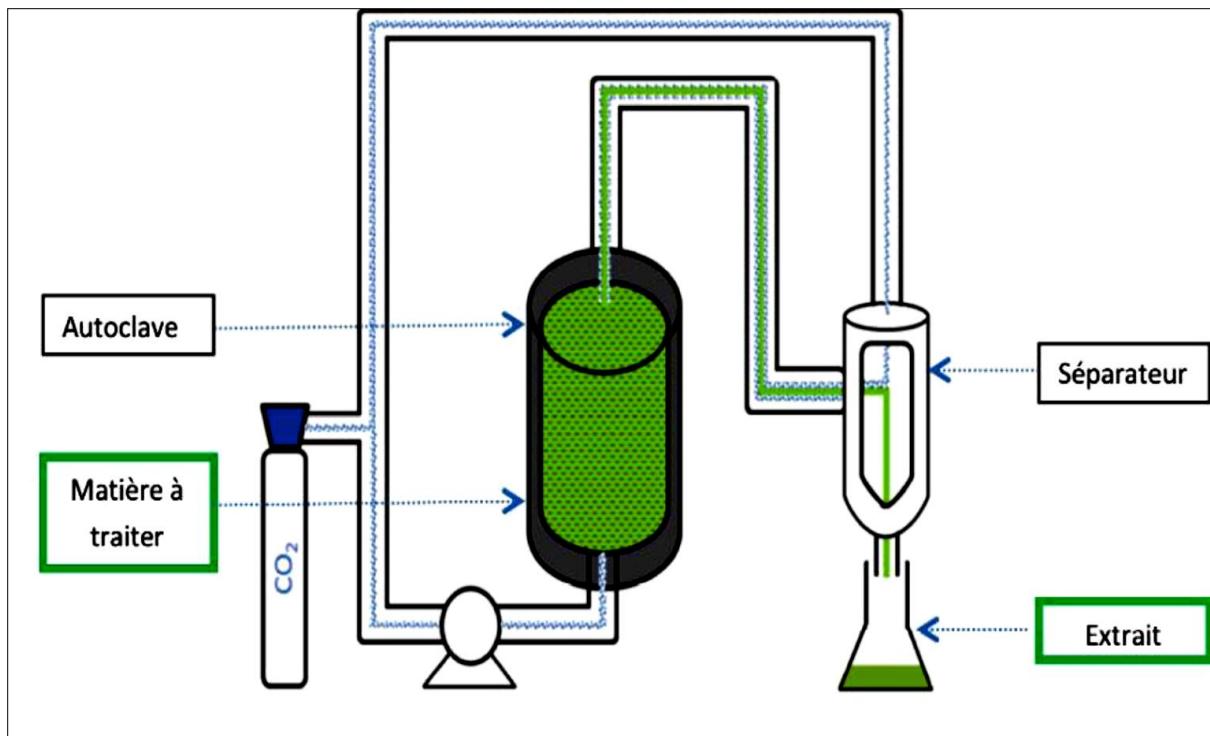


Figure 10. Schéma du dispositif d'extraction d'huile essentielle par CO₂ supercritique

II.1.11. L'extraction par enfleurage

Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques de verre recouvertes de minces couches de graisse (graisse animale type saindoux). Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre de 24 heures (Jasmin) à 72 heures (Tubéreuse). Les pétales sont éliminées et remplacées par des pétales fraîches jusqu'à saturation du corps gras. On épouse ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide (**Belaïche, 1979** ; **France Ida, 1996**).

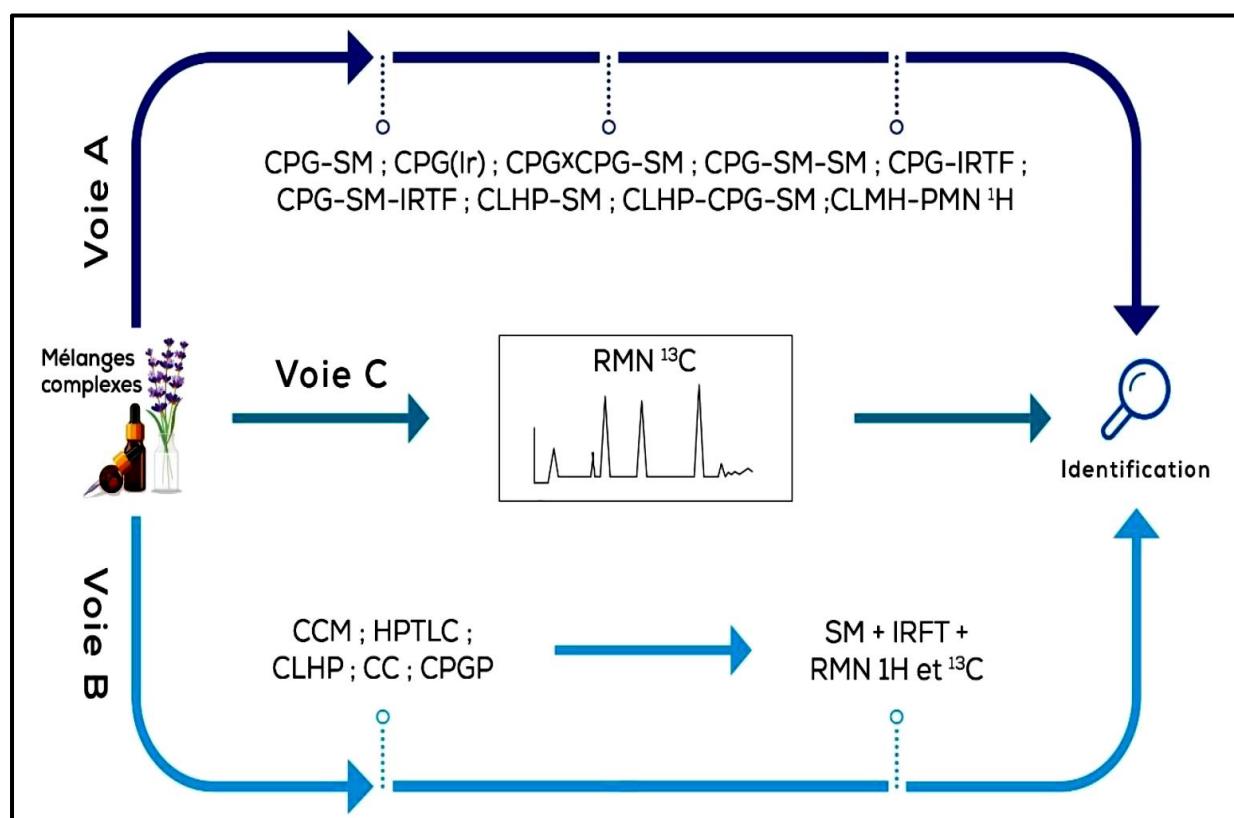
Cette technique laborieuse, qui demande une grande labilité, est de moins en moins employée au profit de l'extraction par les solvants, en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite.

II.2. Identification et analyse des constituants dans un mélange complexe

Les produits naturels d'origine végétale extraits, huiles essentielles, résines sont de nos jours très recherchés. Ils se présentent pratiquement toujours sous forme d'un mélange complexe constitué de plusieurs dizaines -voire d'une centaine et plus de composés en

proportions variables. Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que la pharmacie, le cosmétique, la parfumerie et l'agro-alimentaire. De plus, dans le domaine industriel, les molécules qui peuvent en être isolées, dans la plupart des cas optiquement actives, constituent des substrats intéressants pour l'hémi-synthèse de produits pharmaceutiques, de vitamines, de substances odorantes, etc. (**Bruneton, 1993**).

Cependant, l'identification et la quantification des constituants d'un mélange naturel demeurent toujours des opérations délicates qui nécessitent souvent l'utilisation conjointe de plusieurs techniques analytiques complémentaires (**Joulain, 1994** ; **Coleman et Lawrence, 1997**). L'analyse de la composition chimique d'un mélange naturel, telle qu'une huile essentielle s'effectue de manière conventionnelle selon les voies A ou B (Figure 10).



CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse ; **SM** : Spectrométrie de Masse ; **IRFT** : Infra -Rouge à Transformée de Fourier ;
CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance ; **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire ;
CCM : Chromatographie sur Couche Mince ; **CC** : Chromatographie sur Colonne ; **CPGP** : Chromatographie en Phase Gazeuse Préparative ; **HPTLC** : Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance.

Figure 11. Méthodes d'analyse d'un mélange complexe (adaptée de **Nam, 2014**)

L'analyse peut également être menée selon la voie C (**Figure 11**) qui met en oeuvre la Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN ^{13}C) pour l'identification des composés en mélange sans séparation préalable ou précédée d'une étape de fractionnement réduite au minimum. Cette technique peut en outre être employée pour la quantification des constituants si nécessaire.

II.2.1. Analyse par des couplages « en ligne » : Voie A

La voie A met en œuvre le couplage « en ligne » des techniques chromatographiques et spectroscopiques.

II.2.1.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les premières applications sont maintenant vieilles de plus de 60 ans. Son développement qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême sensibilité, à sa polyvalence, à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent encore plus son intérêt. La séparation sur la colonne se faisant sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. C'est sans doute la principale contrainte à laquelle il faut penser avant de choisir cette technique, puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et suffisamment volatils. La très grande sensibilité des détecteurs permet de déceler des quantités de l'ordre du picogramme pour certains composés (**Rouessac *et al.*, 2004**).

Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée. La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande répétabilité des temps de rétention. L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase

stationnaire. Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir pour des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre (**Rouessac et al., 2004**).

La CPG permet aussi, grâce à la comparaison des aires des pics, de fournir une quantification relative des constituants. L'identification d'un composé ne peut être basée uniquement sur la connaissance de son temps de rétention (tr). En effet, cette valeur dépend fortement de plusieurs paramètres concernant la phase stationnaire (nature, vieillissement) et les conditions expérimentales (programmation de température). Aussi, dans le domaine des huiles essentielles, les constituants sont caractérisés par un couple d'indices de rétention (Ir) (plus fiables que les temps de rétention), l'un obtenu sur colonne apolaire, l'autre sur colonne polaire (colonnes capillaires). Ceux-ci sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étales d'alcanes linéaires à température constante (Indice de Kováts, IK) (**Kováts, 1965**) ou en programmation de température (Indices de rétention, Ir) (**Van Den Dool et Kratz, 1963**). Ils sont ensuite comparés avec ceux de composés de référence, mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature.

Cependant, des informations supplémentaires sont nécessaires pour établir la structure chimique de ces composés séparés et quantifiés. Cette information est fournie par des détecteurs dont le signal est lié à la structure chimique, qui est des détecteurs spectroscopiques ou spectrométriques (**Jennings et Shibamoto, 1980**). Parmi eux, le plus utilisé, est le détecteur spectrométrique de masse (SM).

II.2.1.1. Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique

II.2.1.1.1. Les couplages CPG-SM, CPG-SM(ICP) et CPG-SM(ICN)

Le couplage de la CPG avec la spectrométrie de masse (SM) en mode impact électronique (IE) est probablement le plus répandu dans les laboratoires d'analyses. Ce couplage a l'avantage, dans la majorité des cas, de fournir des informations concernant la masse molaire d'un composé et d'autre part d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques informatisées ou sous format

papier construites au laboratoire ou commerciales (**Masada, 1976** ; **Jennings et Shibamoto, 1980** ; **Sandra et Bicchi, 1987**; **Mc Lafferty et Stauffer, 1994** ; **Adams, 1989 et 2001** ; **Joulain et König, 1998**). En règle générale, l'utilisation de la bibliothèque de spectres réalisée au sein du laboratoire permet d'obtenir des résultats plus fiables, ceci est particulièrement vrai pour l'analyse des huiles essentielles comprenant un grand nombre de sesquiterpènes, qui, construits à partir d'un même synthon isoprénique, présentent des spectres de masse souvent identiques ou insuffisamment différenciés.

Des informations complémentaires peuvent être obtenues avec des techniques « d'ionisation douce » telles que l'ionisation chimique positive (ICP) ou l'ionisation chimique négative (ICN) (**Lange et Schultze, 1988** ; **Schultze et al., 1992** ; **Paolini et al., 2005**). L'ICP et l'ICN produisent des ions quasi-moléculaires dont l'observation donne accès à la masse molaire des composés. Ainsi, la SM-ICP a permis de différencier les quatre stéréo-isomères de l'isopulégol (**Lange et Schultze, 1988**). Toutefois, cette technique a montré ses limites pour l'identification de molécules possédant des structures très proches. C'est le cas par exemple du géraniol et du nérol, qui ne diffèrent que par la stéréochimie d'une des doubles liaisons. En effet, ils possèdent des spectres de masse ICN identiques (**Bruins, 1979**). Il faut également prendre en compte la difficulté d'obtenir des spectres, en SM (ICN) ou en SM (ICP), reproductibles d'un laboratoire à l'autre. C'est pourquoi, cette technique doit surtout être considérée comme une technique complémentaire de la SM(IE) pour l'identification des constituants des huiles essentielles (**Zupanc et al., 1992**).

La CPG bidimensionnelle (CPG x CPG ou CPG-2D) est également une technique particulièrement intéressante. En effet, l'utilisation de deux séparations consécutives sur deux colonnes de natures différentes, entraîne une diminution, voir une suppression, des coélutions contrairement à la CPG-1D. Grâce à cette technique chromatographique, **Filippi et al. (2013)** ont pu identifier 135 composés dans l'huile essentielle de vétiver, réputée pour être l'une des plus complexes d'un point de vue analytique.

II.2.1.1.2. Les couplages CPG-IRTF et CPG-IRTF-SM

En complément de l'utilisation de la CPG-SM, un spectrophotomètre Infra Rouge par Transformée de Fourier (IRTF) peut également être couplé à la CPG. La spectroscopie infrarouge renseigne sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules et permet également de différencier les isomères par l'examen de la partie de spectre dite « des empreintes digitales ». Le spectre obtenu peut être comparé à ceux contenus dans une bibliothèque informatisée de spectres Infrarouge. Le couplage CPG-IRTF peut s'appliquer à l'analyse de diverses familles de composés : les produits pétroliers et leurs additifs, les arômes, les essences naturelles, les produits de synthèse (**Iob et al., 1998** ; **Thomaidis et Georgiou, 1999**). Son efficacité a été démontrée notamment pour l'étude de molécules présentant des spectres de masse superposables tels que les stéréo-isomères du farnésol et du menthol (**Coleman et al., 1989**). Par exemple, le couplage CPG-IRFT a permis l'identification du germacrène B qui se transforme partiellement en γ -élémène dans les huiles essentielles d'orange et de pamplemousse (**Chamblee et al., 1997**). Ainsi, la CPG permet dans la grande majorité des cas une individualisation des constituants nécessaire pour une bonne identification. Cependant, de nombreux métabolites secondaires de masse élevée donc peu volatils nécessitent l'utilisation d'une technique chromatographique en phase liquide.

II.2.1.1.3. Le couplage CLHP-SM et CLHP-SM-SM

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) est une technique d'analyse et de quantification d'un grand nombre de molécules, polyvalentes et très répandues. De par la nature des constituants des huiles essentielles, la CLHP est utilisée dans de très rares cas. Il s'agit généralement de l'analyse de composés thermolabiles et/ou très polaires ou de composés peu volatils dans les essences de *Citrus*. Dans le cas d'extraits végétaux complexes, les temps nécessaires à la séparation des composés peuvent être très longs, il est alors intéressant d'utiliser une Chromatographie Ultra Haute Performance (UCLHP) plutôt qu'une CLHP (**Fernandez et Chemat, 2012**). Le couplage CLHP-SM a été utilisé pour l'identification d'esters sesquiterpéniques, d'alcaloïdes, des xanthones, des séco-iridoïdes, dans des extraits méthanoliques mais aussi des psoralènes et des flavones à

partir d'huiles essentielles (**Cremin et al., 1995 ; Dugo et al., 2000 ; Mroczek et al., 2004**). Il est cependant, à noter que l'utilisation de conditions opératoires très variées surtout concernant les colonnes ne permet pas des comparaisons faciles. Par exemple, la séparation par CLHP, de deux alcaloïdes : hyoscyamine et scopolamine a fait l'objet depuis le premier article publié en 1976 de plus d'une centaine de publications. Aucune standardisation n'a été proposée ou ne s'est imposée. Il s'avère donc difficile de choisir les conditions opératoires, que ce soit en laboratoire ou dans l'industrie (**Verpoorte et al., 2010**).

II.2.1.1.4. Le couplage CLHP-CPG-SM

De manière simplifiée, on peut considérer que le couplage CLHP-CPG-SM permet une séparation préalable des constituants du mélange en fonction de la famille à laquelle ils appartiennent (CLHP), puis l'individualisation des constituants d'une même famille (CPG), et l'identification étant réalisée par SM. Ce dispositif a permis l'identification de constituants présents à l'état de traces dans les huiles essentielles d'agrumes avec une grande fiabilité (**Munari et al., 1990 ; Mondello et al., 1995**).

II.2.1.1.5. Le couplage CLHP-RMN ^1H

La RMN du ^1H apporte des informations extrêmement précieuses sur la structure des molécules, mais présente l'inconvénient d'être beaucoup moins sensible que les techniques spectroscopiques décrites précédemment (IR et surtout SM).

Néanmoins, la mise en œuvre de couplage CLHP-RMN ^1H a été rendu possible grâce au développement d'aimants supraconducteurs de plus en plus puissants (jusqu'à 23,5 Tesla), permettant ainsi d'abaisser le seuil de détection pour les composés à des valeurs de l'ordre du nanogramme. Ce couplage a aussi été rendu possible grâce au développement de colonnes capillaires dont la faible consommation en éluant permet d'employer des solvants deutérés, évitant ainsi d'avoir recours à des techniques d'irradiations sélectives (**Wolfender et al., 1998 ; Albert et al., 1999 ; Victoria et Elipe, 2003**).

II.2.1.1.6. Le couplage CLHP-RMN ^1H -SM

Ce couplage permet de détecter et d'identifier des composés présents dans des échantillons biologiques complexes, dans des extraits de plantes (**Corcoran et Spraul, 2003 ; Yang, 2006**) ou encore de détecter des impuretés dans un médicament (**Lindon et al., 2000**). Même si ce couplage présente quelques inconvénients (utilisation de solvants deutérés comme D_2O , CD_3CN , CD_3OD par exemple), l'utilisation conjointe des deux techniques spectroscopiques facilite toutefois l'identification de composés.

Face à la complexité de certains mélanges, il est nécessaire de procéder en deux étapes : la purification des constituants de mélanges particulièrement complexes puis leur identification, illustrée par la voie B ci-dessous.

II.2.2. Identification des constituants après purification : Voie B

La voie B est constituée principalement de deux étapes. Le mélange est d'abord fractionné à l'aide de différentes techniques chromatographiques, telles que la chromatographie sur colonne (CC), la chromatographie sur couche mince (CCM) ou la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC), la CLHP et la CPG préparative (CPGP), précédées ou non d'une distillation fractionnée ou d'une cristallisation.

Les différents constituants isolés dans des fractions enrichies sont ensuite identifiés par comparaison de leurs données spectrales avec celles des composés de référence (spectre de masse, spectre IR, spectres de RMN ^1H ou ^{13}C , éventuellement RMN bidimensionnelle).

Cette voie se révèle extrêmement fiable mais elle peut s'avérer coûteuse en temps particulièrement lorsque les molécules isolées sont déjà décrites dans la littérature. Cette voie d'analyse en deux étapes (purification-identification) a été la première à être utilisée dans le domaine des huiles essentielles. L'analyse par les couplages en ligne (voie A), plus rapide, s'est ensuite imposée. Cette voie est néanmoins toujours utilisée dans le cas d'huiles essentielles complexes car sa grande fiabilité compense l'investissement en temps qu'elle requiert. Les travaux de **Weyerstahl et al., 1996** ;

1997a ; 1997b ; 1998 ; 1999a ; 1999b ; 2000a ; 2000b ; 2000c) illustrent parfaitement l'intérêt pour cette séquence à travers l'étude de la composition chimique de diverses huiles essentielles très complexes. C'est le cas de l'huile essentielle de vétiver d'Haïti, qui est composée de nombreux sesquiterpènes aux propriétés physico-chimiques et spectroscopiques voisines. Une partition acido-basique a alors été réalisée. La partie neutre a été soumise à une distillation fractionnée qui a permis de séparer les produits lourds des produits légers, puis les différents constituants ont été séparés par CC répétitives, puis éventuellement par CCM. Ces constituants ont ensuite été analysés par CPG-SM, RMN 1H et parfois par RMN ¹³C. La partie acide a été soumise à une réaction d'estérification ou de réduction avant la séparation des constituants. Près de 170 composés sesquiterpéniques (mono- ou poly-fonctionnalisés) ont ainsi été identifiés. Certains de ces composés possèdent des squelettes originaux et rares tels que prezizaane, zizaane, khusiane, cyclopacamphane, spirovétivane, épi-, séco- et nor-eudesmanes, oppositane, etc. (Weyerstahl *et al.*, 2000c).

Parmi les travaux récents, Delort et Jacquier (2009) ont analysé par CPG-SM et par RMN ¹³C chaque fraction obtenue après séparation par chromatographies répétitives de l'huile essentielle de fruits de *Citrus australasica*. Les auteurs ont identifié 195 composés (majoritairement le limonène et l'isomenthone) dont 4 nouveaux esters menthaniques.

Si la voie A, grâce à sa rapidité, est particulièrement adaptée aux analyses de routine, la voie B garantit l'identification des composés. Cependant, les diverses étapes de fractionnement et de purification demandent souvent un important investissement en temps. Une troisième voie, la voie C, intermédiaire par rapport aux précédentes, puisqu'elle est basée sur l'identification et/ou la quantification par RMN ¹³C des principaux composés des mélanges naturels (huiles essentielles, extraits végétaux, résines, huiles végétales, etc.), sans séparation préalable.

II.2.3. Analyse par RMN du ¹³C sans séparation préalable : Voie C

Les premiers travaux relatifs à l'utilisation de la RMN ¹³C en tant qu'outil analytique des mélanges naturels ont été réalisés par Formácek et Kubeczka (1982), Kubeczka

et Formàcek, (1984) et Kubeczka *et al.*, (1988). En général, la RMN ^{13}C a été utilisée pour confirmer l'identification des constituants préalablement identifiés par une autre technique analytique, la CPG-SM usuellement. Dans ce contexte, dès le début des années 80, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse a initié, puis a mis au point et développé, une véritable méthode d'analyse des mélanges complexes naturels par RMN ^{13}C impliquant inévitablement une informatisation de la recherche. Cette méthode est efficace, fiable et complémentaire des techniques conventionnelles (Tomi *et al.*, 1995 ; Bradesi *et al.*, 1996 ; Tomi et Casanova 2006 ; Bighelli et Casanova, 2009).

II.2.3.1. Intérêt de la RMN du ^{13}C

En dépit de sa faible abondance isotopique naturelle (1,1%) et d'un rapport gyromagnétique 5 700 fois moins sensible que celui du proton (Günther, 1994), le ^{13}C est malgré tout préféré aux autres noyaux dans le domaine de l'analyse des mélanges complexes car il présente les avantages suivants :

- Le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques et les différents atomes présents sont, à quelques exceptions près, magnétiquement non équivalents. Donc, on observe en général dans un spectre de RMN du ^{13}C autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule ;
- Les spectres de RMN du ^{13}C peuvent être simplifiés par irradiation par découplage total des noyaux d'hydrogène, ce qui permet de n'observer dans le spectre qu'une seule raie de résonance par carbone. En plus l'effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) résultant de ce découplage des protons produit une augmentation d'intensité du signal (Neuhaus et Williamson, 1989) ;

Le domaine de résonance du carbone s'étend sur une plage beaucoup plus vaste que celle du proton (schématiquement, 240 ppm par rapport à 12 ppm), ce qui améliore notamment la résolution effective c'est-à-dire la dispersion spectrale (Tomi *et al.*, 1995) ;

- L'enregistrement des spectres de RMN du ^{13}C est réalisé à température ambiante. Cela évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles ;
- La RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré et soumis à d'autres analyses.

II.2.3.2. Identification des constituants en mélange par RMN du ^{13}C

L'identification des constituants d'un mélange par RMN ^{13}C est réalisée par comparaison des déplacements chimiques des carbones du mélange avec ceux des composés de référence contenus dans une ou plusieurs bibliothèques de spectres.

Avec cette méthode, les composés ne sont pas préalablement purifiés, contrairement aux précédentes techniques de couplage entre un chromatographe et un spectromètre. Pour identifier un composé au sein d'un mélange, il faut donc être à même de pouvoir observer les signaux qui lui appartiennent et de les individualiser, puis d'attribuer les déplacements chimiques à une molécule donnée. Pour cela, les conditions expérimentales d'enregistrement des spectres doivent être optimisées et standardisées de façon à permettre une bonne reproductibilité des résultats obtenus. Il est également important de savoir apprécier la concentration minimale d'un produit minoritaire dans le mélange, permettant l'observation de ses signaux dans le spectre.

II.2.3.3. Observation des signaux

L'observation des raies de résonance des carbones d'une molécule dans le spectre d'un mélange dépend de la quantité de produit disponible, de sa solubilité et de sa viscosité dans un solvant choisi, de la sensibilité de l'appareil qui s'exprime par le rapport signal sur bruit (S/B).

Le manque de sensibilité (S/B) peut être pallié par :

- L'utilisation d'une cryosonde (sonde à antennes refroidies) reliée à une unité cryogénique à l'hélium. Elle permet de multiplier par 4 la sensibilité et donc de diminuer d'un facteur 16 la durée des expériences ;

- De spectromètres à haut champ puisque sa sensibilité des aimants augmente avec le champ magnétique (23,5 Tesla pour les plus performants) ;
- De convertisseurs numériques performants qui améliorent le traitement des données et de fonctions mathématiques (exponentielle) effectuées directement sur le signal de la FID (Free Induction Decay ou décroissance libre d'induction) avant la transformée de Fourier (**Williamson et Neuhaus, 1989** ; **Günther, 1994** ; **Claridge, 1999** ; **Hesse et al., 2008**).

II.2.4. Méthode d'analyse développée au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse

II.2.4.1. Principe de la méthode

Depuis 1989, l'équipe « Chimie et Biomasse » utilise la RMN du ^{13}C comme outil d'analyse des mélanges naturels. L'objectif à atteindre a pour but l'identification, et éventuellement la quantification, des constituants de mélanges naturels sans étape préalable de purification ou avec un fractionnement réduit autant que possible (**Corticchiato et Casanova, 1992** ; **Tomi et al., 1995**).

La particularité de cette méthode réside dans l'informatisation du traitement des données spectroscopiques, grâce à un logiciel d'aide à l'identification spécialement élaboré au laboratoire. Effectivement, les déplacements chimiques du mélange sont directement comparés avec ceux de composés de référence présents dans des bibliothèques de spectres (**Figure 11**). L'enregistrement des spectres de référence et des mélanges est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales (nature du solvant, concentration, paramètres d'enregistrement des spectres).

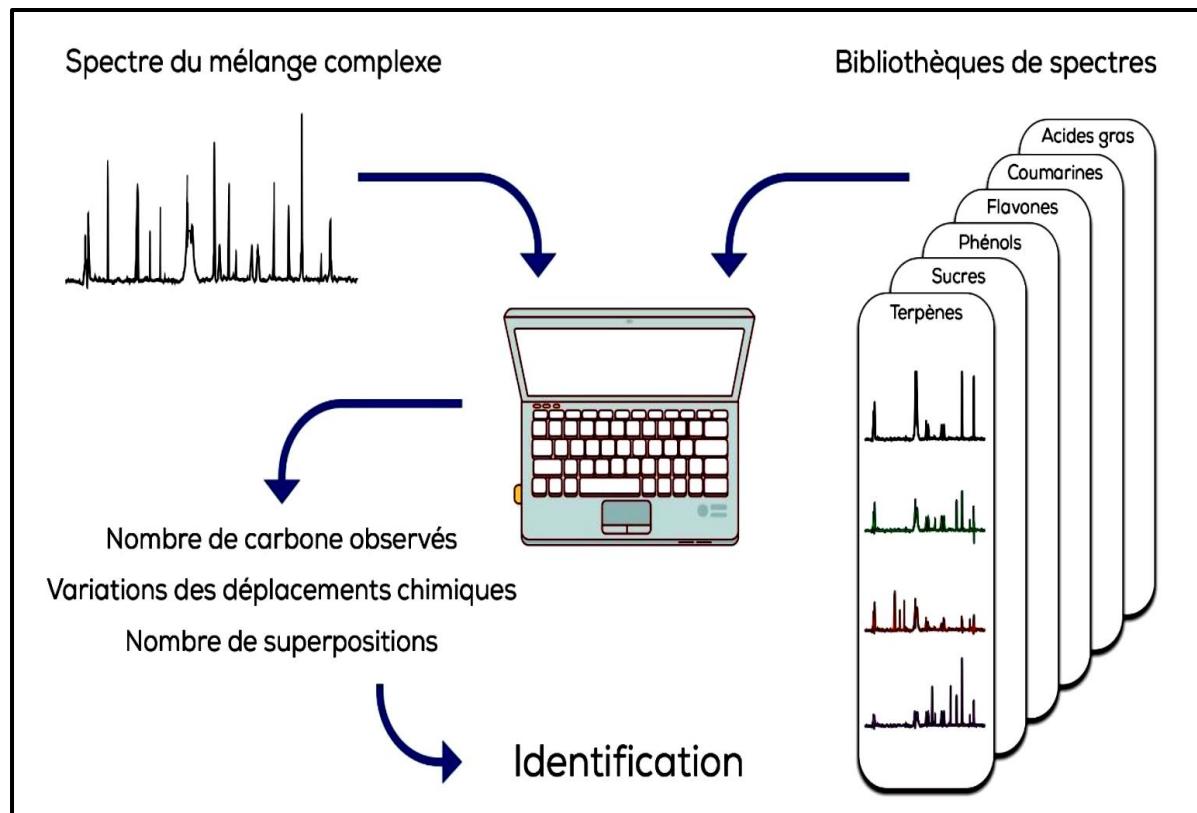


Figure 12. Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du ^{13}C
(adaptée de Nam, 2014)

L'identification des composés présents dans un mélange est réalisée par la prise en compte de trois paramètres directement accessibles par le logiciel :

Le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;

- Le nombre de superpositions de pics qui peuvent se produire quand deux carbones appartenant à des molécules différentes présentent fortuitement le même déplacement chimique ;

- Les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence.

De plus, l'intensité des pics permet éventuellement de contrôler l'appartenance du signal d'un carbone à tel ou tel composé. Cette méthode a été appliquée à différentes familles de molécules (terpènes, lipides, sucres, phénols) selon un protocole expérimental spécifiquement adapté à chaque famille (nature du solvant, dilution, paramètres d'enregistrement des spectres). Ainsi, différentes bibliothèques de spectres ont été créées à partir de produits commerciaux et sont continuellement enrichies avec les spectres des produits isolés à partir de mélanges naturels ou bien encore préparés par hémi-synthèse.

L'utilisation de la RMN du ^{13}C , devient particulièrement intéressante lorsqu'elle permet d'identifier rapidement et sans ambiguïté, des composés délicats à analyser par les techniques conventionnelles. Dans le domaine des huiles essentielles, des résultats très intéressants ont été obtenus par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse.

- Dans un même mélange, deux douzaines de composés avaient été identifiés dans une huile essentielle avec un spectromètre pourvu d'un aimant de puissance 4,7 Tesla. L'utilisation d'un appareil fonctionnant avec un aimant de 9,4 Tesla a permis un gain pouvant atteindre 50%. Ainsi, dans le meilleur des cas, une huile essentielle de *Piper bavinum* du Viêt-Nam, 38 constituants, présents avec des teneurs comprises entre 0,4 et 10% ont pu être identifiés sans aucune séparation préalable (**Lesueur et al., 2009**) ;
- La teneur minimale des composés identifiables avec le spectromètre (9,4 T) est de l'ordre de 0,5%. Parfois, des composés présents à des teneurs inférieures peuvent être identifiés (0,4% et même 0,3%) ;
- En général, tous les carbones des molécules identifiées sont observés, à l'exception de certains carbones quaternaires (qui relaxent moins bien que les carbones liés à des protons et donnent donc un signal moins intense dans les conditions de l'expérience) appartenant aux composés minoritaires ;
- Le nombre de superpositions est limité et ne constitue pas, dans la grande majorité des cas, un facteur limitant ;

- Les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) sont généralement inférieures à 0,05 ppm pour la très grande majorité des cas. Il y a quelques exceptions, en particulier avec les composés phénoliques (thymol, carvacrol...) dont certains carbones présentent de plus importantes variations des déplacements chimiques selon la polarité et la fonctionnalisation des autres constituants du mélange. Dans ce cas précis, une dilution permet de diminuer ces variations importantes de déplacements chimiques.

Chapitre III

Activités biologique des huiles essentielles

III. Les huiles essentielles

III.1. Activité antibactérienne

Une substance antibactérienne ou bactéricide est une substance possédant la capacité de tuer des bactéries, elle fait intervenir tous les caractères structuraux et métaboliques qui leur donnent une individualité parmi les microorganismes et permettent de les distinguer d'une part des champignons inférieurs et des protozoaires, d'autre part (**Loiseau-Marolleau, 1968**).

La détection des propriétés biologiques nécessaires pour la survie des plantes est également la base dans la recherche de propriétés biologiques similaires pour combattre différents micro-organismes responsables de plusieurs maladies infectieuses chez l'homme et l'animal. Ces recherches ont tendance à faire face à la résistance aux antibiotiques des microorganismes pathogènes (**Miguel, 2010**). Les infections microbiennes ont été la principale cause de maladies tout au long de l'histoire de l'humanité **Dzidic et al., (2008)**. Tous les antimicrobiens d'origine végétale ont un énorme potentiel thérapeutique.

Plusieurs plantes ont été utilisées vue leurs caractéristiques antimicrobiennes, qui sont essentiellement dues aux composés du métabolisme secondaire de la plante. Néanmoins la première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (**Boyle, 1995**). Alors depuis de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (**Burt, 2004**) (Figure 18). Ils sont efficaces dans le traitement des maladies infectieuses, tout en atténuant ou en évitant un grand nombre d'effets secondaires qui sont souvent associés aux agents synthétiques **Arshad et al., (2010)**.

III.2. Composition chimique des huiles essentielles

Pour comprendre comment fonctionne les huiles essentielles et quelles sont leurs propriétés, il est important de savoir les molécules qui la composent (**Koziol, 2015**). Les huiles essentielles sont des mélanges de substances aromatiques qui sont présentées à l'état naturel, en faible quantité dans le végétal (**Bruneton, 1999**).

D'après **Abad et al., (2012)**, les huiles essentielles sont des mélanges naturels très complexes qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants à des concentrations très différentes. Ces huiles se composent essentiellement des composés volatils d'origine terpénoides ou non terpénoides. Les composés terpénoides : monoterpènes (C₁₀), sesquiterpènes (C₁₅), diterpènes (C₂₀), triterpènes (C₃₀). Ce sont les molécules les plus fréquemment rencontrées dans les HEs et les non terpènes (phénylpropanoïde) sont également très fréquents (**Ralf, 2010**). Le **tableau 01** présente les composants des huiles essentielles qui peuvent être classés en trois groupes.

Mais elles peuvent contenir plus de 300 composés chimiques divers (**Labiod, 2016**). Ces compositions chimiques peuvent varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales, les modes et les opérations de traitement pour l'extraction (**Ouis, 2015**), elles dépendent fortement de l'influence des conditions avant, pendant ou après l'extraction de l'essence, aussi à prendre en considération le stress climatique pendant la croissance ou la maturité, la nutrition, la période de récolte, le séchage, le stockage post-récolte et le procédé entamé pour l'obtention de ces huiles.

De plus, elle dépend de l'organe végétal, l'écotype ou la variété chimiques ou "chémotypes" **Baranauskaitė et al., (2016)**; **Rodriguez-Solana et al., (2014)**, mais principalement la composition de l'essence produite par la plante, celle-ci étant fonction de facteurs environnementaux mais surtout du patrimoine génétique de la plante (**Descheppe, 2017**).

Tableau 04. Classement des composants des huiles essentielles (**Bourrain, 2013**).

Composants	Exemples
Les terpènes	monoterpènes et les sesquiterpènes
Les composés aromatiques	alcool cinnamique, coumarine
D'autres composés divers	acides, alcools, aldéhydes, esters...

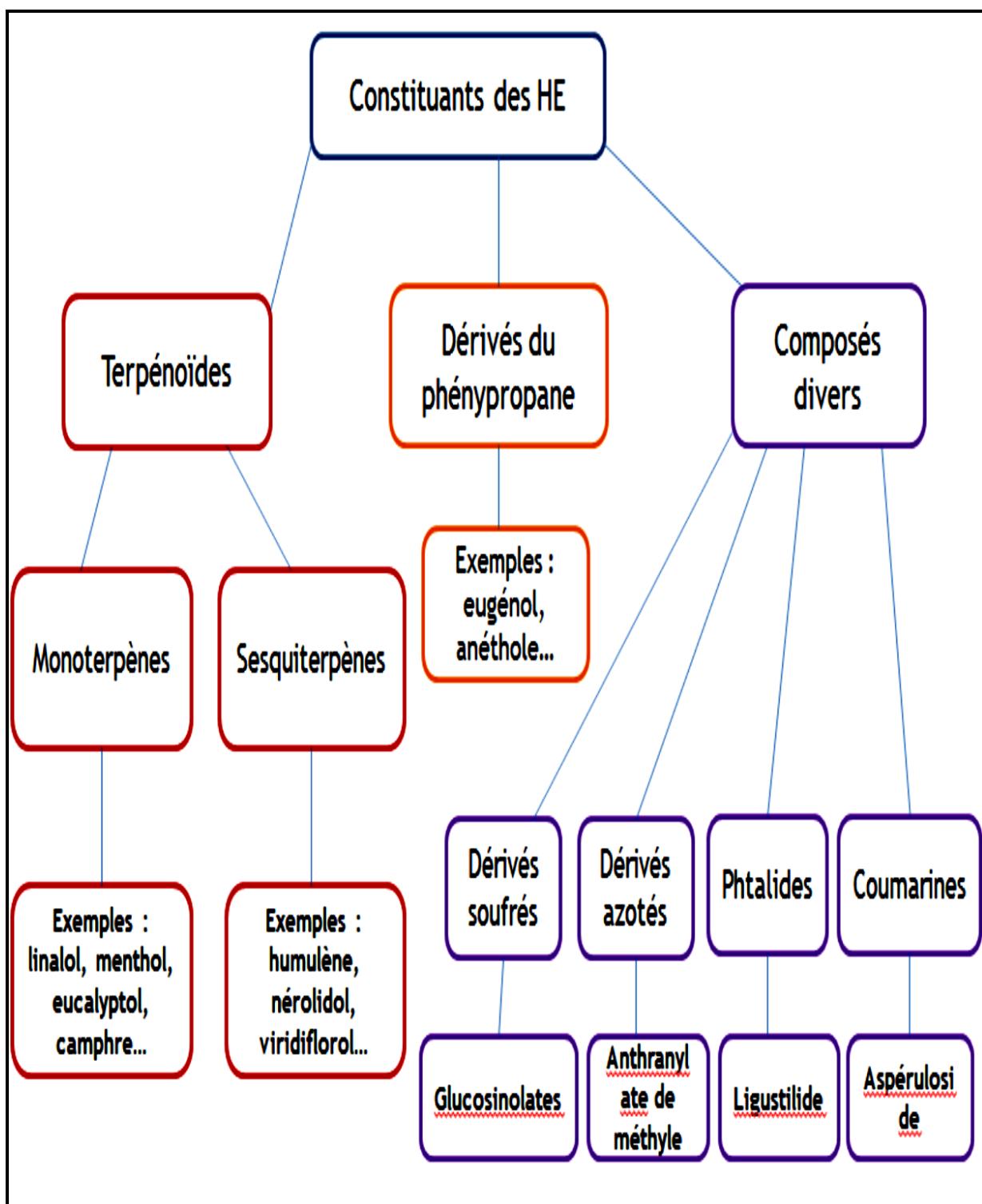


Figure 13. Schéma représentant les principaux constituants des HEs (Laëtitia, 2015).

Tableau 05. Différents types de molécules dans l'huile essentielle (Loupy, 2006).

	Formule moléculaire	Température d'ébullition	Solubilité dans L'eau (g.L ⁻¹)
<i>Monoterpènes</i>			
Limonène	C ₁₀ H ₁₆	175.4	< 10 ⁻³
Pinène	C ₁₀ H ₁₆	157.9	< 10 ⁻³
Sabinene	C ₁₀ H ₁₆	164	< 10 ⁻³
Myrcène	C ₁₀ H ₁₆	167	< 10 ⁻³
γ-Terpinène	C ₁₀ H ₁₆	183	< 10 ⁻³
para-Cymène	C ₁₀ H ₁₆	173.9	< 10 ⁻³
<i>Sesquiterpènes</i>			
β-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	268.4	< 10 ⁻³
α-Santalene	C ₁₅ H ₂₄	247.46	< 10 ⁻³
α-Zingeberene	C ₁₅ H ₂₄	270.7	< 10 ⁻³
β-Curcumene	C ₁₅ H ₂₄	266	< 10 ⁻³
<i>Diterpène</i>			
Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	335.5	< 10 ⁻³
<i>Alcools</i>			
Géranol	C ₁₀ H ₁₇ OH	229.5	0.67
Linalool	C ₁₀ H ₁₇ OH	198.5	0.67
<i>Aldéhydes</i>			
Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	210.9	2.61
Cuminic aldéhyde	C ₁₀ H ₁₂ O	254.6	0.26
<i>Ketones</i>			
Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	207.4	0.92
Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	230.5	1.60
<i>Phénols</i>			
Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	233	0.85
Eugénol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	255	2.52
<i>Acétates</i>			
Neryl acétate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	274.5	0.71
Linalyl acétate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	220	0.57
<i>Oxydes</i>			
1,8-Cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	174.8	5.8 x 10 ⁻³
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	198.5	0.67

Le chémotype de l'huile essentielle est un élément permettant de différencier les huiles essentielles extraites d'une même espèce ou variété botanique mais de composition biochimique différente.

Ce chémotype est désigné avec une analyse chromatographique et spectrométrique qui reconnaît et identifie les molécules présentes dans l'huile essentielle, cela nous permet de sélectionner et classifier les huiles essentielles pour une utilisation précise et efficace. Les huiles essentielles chémotypées sont recommandées pour l'aromathérapie.

III.2.1. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structures très variées soit cyclique (monocycliques, bicycliques ou tricycliques...), soit à chaîne ouverte (acycliques) (**Ouis, 2015**) ; (**Labiod, 2016**), ainsi leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à cinq atomes de carbone (C₅H₈) (**Hernandez-Ochoa, 2005**) ; (**Fillatre, 2011**).

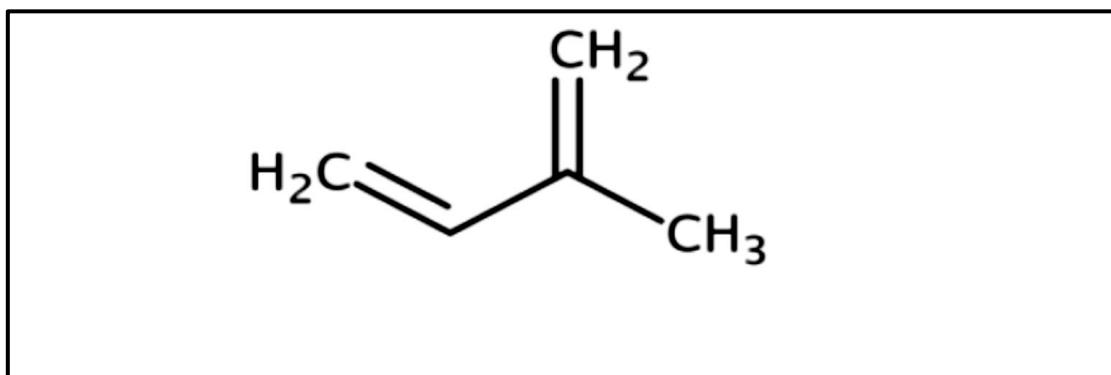


Figure 14. Formule de l'isoprène.

Les terpènes sont subdivisés selon le nombre d'unités isopréniques en :

- hémiterpènes (1 unité : C5), monoterpènes (2 unités : C10),
- sesquiterpènes (3 unités : C15), diterpènes (4 unités : C20),
- sesterpènes (5 unités : C25), triterpènes (6 unités : C30),
- carotènes (8 unités : C40),
- les polyisoprènes (n unités : C₅n) (**Hernandez, 2005**) ; (**Fillatre, 2011**).

Tableau 06. Classement des terpènes selon (Lakhdar, 2015)

Selon la fonction	Selon la structure
Alcools (Géraniol, Linalol)	Linéaire (Farnésène, Farnésol)
Esters (Acétate de linalyle)	Cyclique (Humulène, Zingiberène)
Aldéhydes (Citral, Citronellal)	Bicyclique (Cadinène, Caryophyllène, Chamazulène)
Cétones (Menthone, Camphre, Thuyone)	Tricyclique (Cubébol, Patchoulol, Viridiflorol).
Ethers-oxydes (Cinéole)	Ethère cyclique

Ils sont divisés selon le nombre d'entités isoprènes en **monoterpènes** formés de deux isoprènes (**C₁₀H₁₆**), avec **les sesquiterpènes**, formés de trois isoprènes (**C₁₅H₂₄**), ou encore **les diterpènes**, formés de quatre isoprènes (**C₂₀H₃₂**).

Par contre **les tetraterpènes** sont constitués de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes et **les polyterpènes** ont pour formule générale : (C₅H₈)_n ou « n » peut être de 9 à 30.

Les tépénoides sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide) (**Labiod, 2016**).

Dans les tépénoides, la tête d'un élément isoprène est ordinairement liée à la queue de l'élément suivant, toutefois, on rencontre des exemples de tépénoides où se trouvent des liaisons " tête-tête " et " queue-queue " (**Djellouli., 2008**).

Cependant dans le cas des huiles essentielles, seuls sont rencontrés les tépénoides les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, principalement les mono- et sesquiterpénoides et beaucoup plus rarement, les

diterpénoïdes. Les monoterpénoïdes représentent à eux seuls environ 90% des huiles essentielles (Richter, 1993) ; (Bruneton, 1999); Bakkali et al., (2008) . (Figure14)

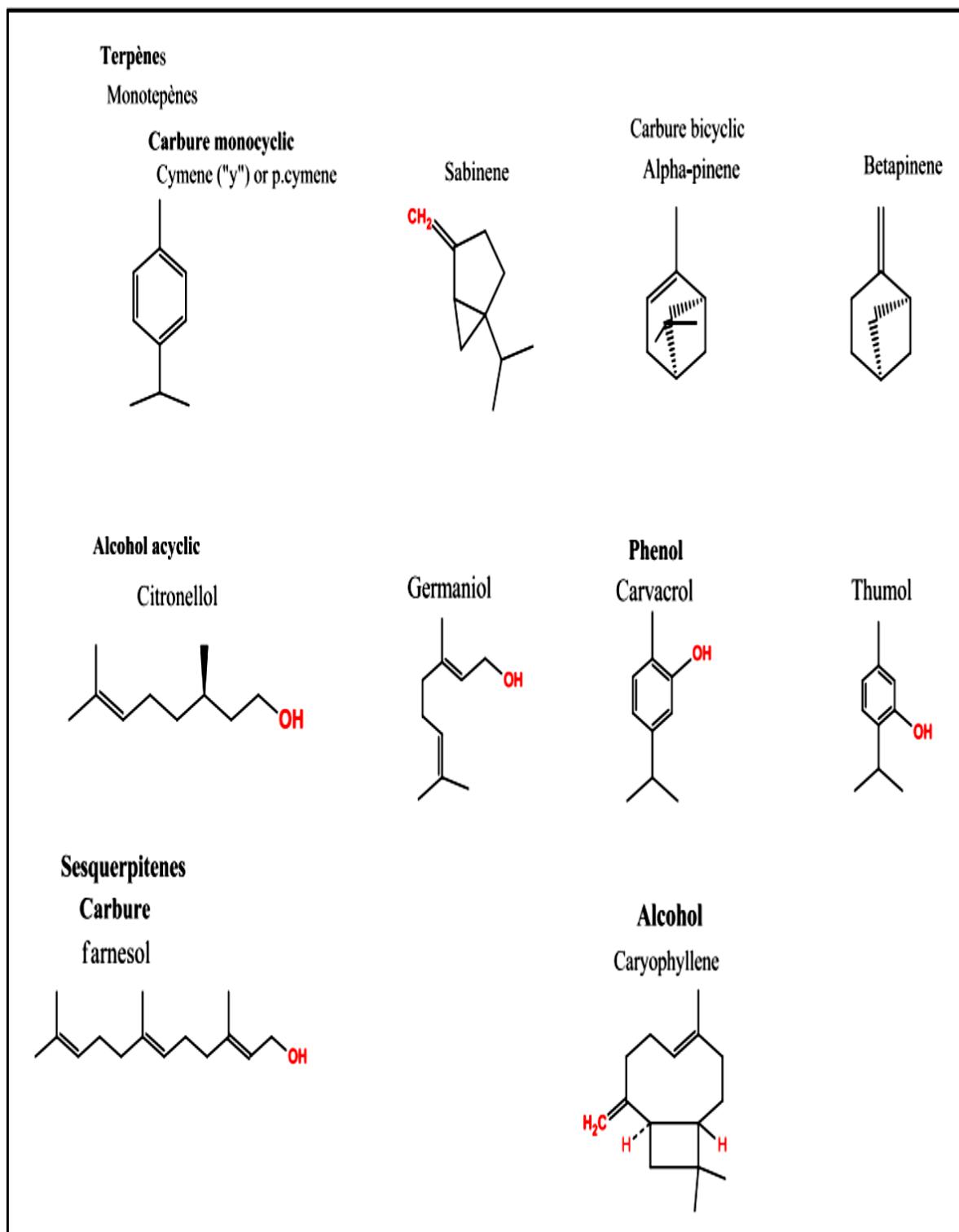


Figure 15. Exemples de Structure chimique de terpènes (Bakkali, 2008)

III.2.1.1. Hemiterpènes

Parmi les composés naturels trouvés dans les plantes, environ 50 composés peuvent être considérés comme hémiterpènes. Seul l'isoprène possède toutes les caractéristiques biogénétiques des terpènes (Breitmaier, 2006).

III.2.1.2. Monoterpènes (Composés à C10)

Les monoterpènes sont constitués par le couplage de deux unités isopréniques ($C_{10}H_{16}$), sont volatils entraînables à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des huiles essentielles, parfois plus de 90 % Bakkali et al., (2008). Ils sont volatils, entraînables à la vapeur d'eau et d'odeur souvent agréable (Labiod, 2016).

Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurelles : les monoterpènes linéaires acycliques comme le montre (Figure 15), les monoterpènes avec un cycle unique monocycliques comme le montre (Figure 16), et ceux avec deux cycles (bicycliques) comme le montre (Figure 17).

Selon (Malecky, 2008), on distingue 4 groupes dans cette catégorie :

- Les hydrocarbonés en $C_{10}H_{16}$ contenant deux doubles liaisons : D-limonène et les phellandrene sont les représentants les plus connus de cette famille.
- Les hydrocarbonés en $C_{10}H_{18}$ contenant une double liaison : les terpinéols sont les plus fréquents dans cette famille.
- Les hydrocarbonés en $C_{10}H_{20}$: les menthanes (hydrocarbures saturés) n'existent pas à l'état naturel, mais on trouve leurs dérivés alcool et cétone correspondants : le menthol et la menthone.
- Les hydrocarbonés en $C_{10}H_{20}$ contenant un oxyde : dans cette famille, le cinéole ou l'eucalyptol sont très abondants.

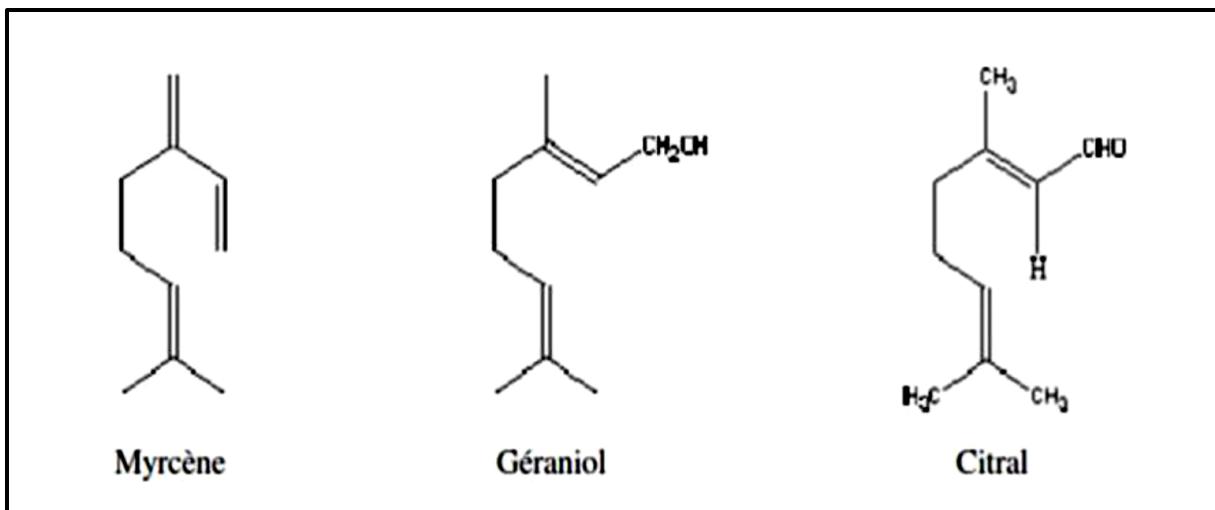


Figure 16. Structures de quelques Monoterpènes acycliques (Bruneton, 1999).

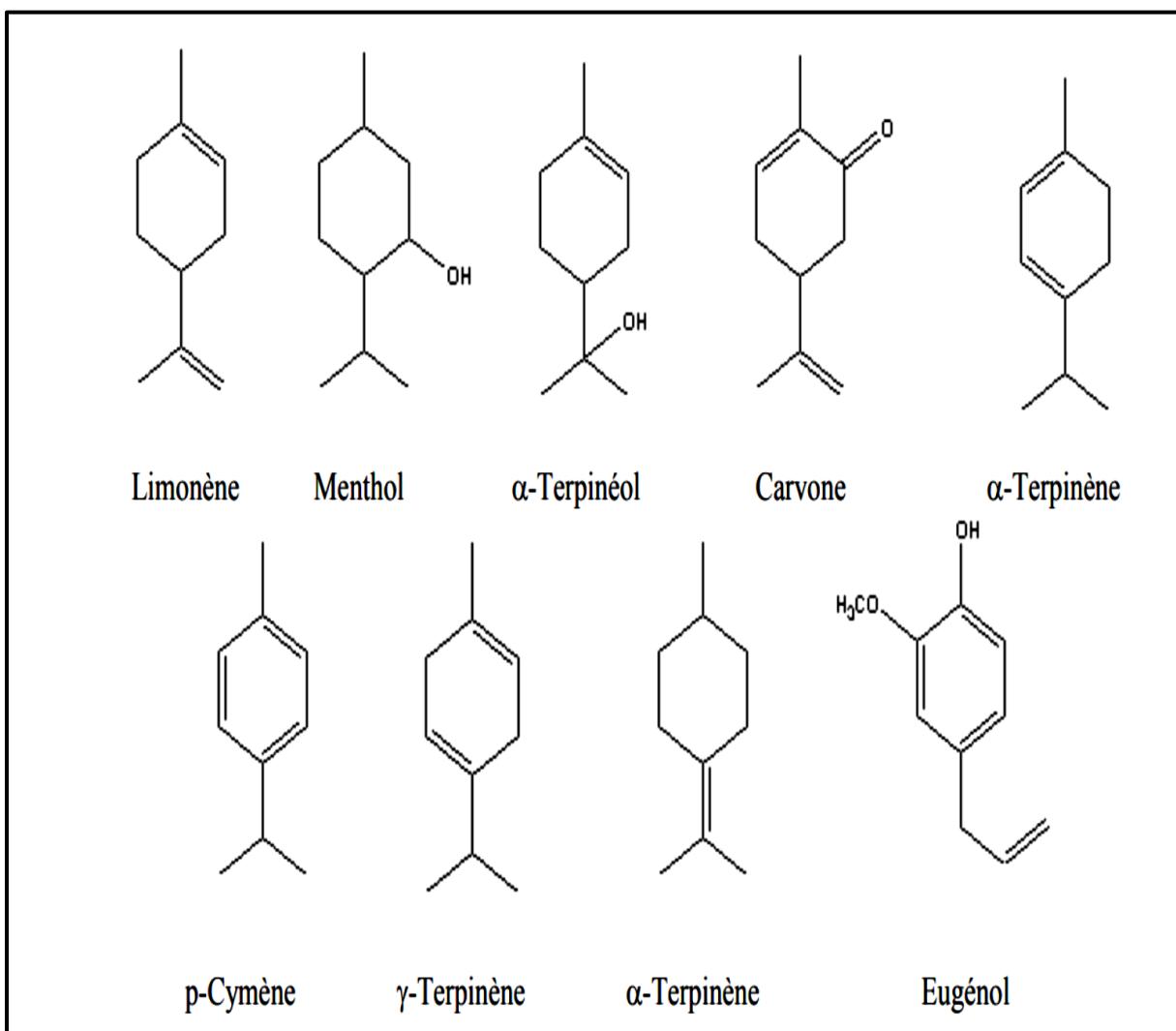


Figure 17. Structures de quelques Monoterpènes monocycliques (Bruneton, 1999).

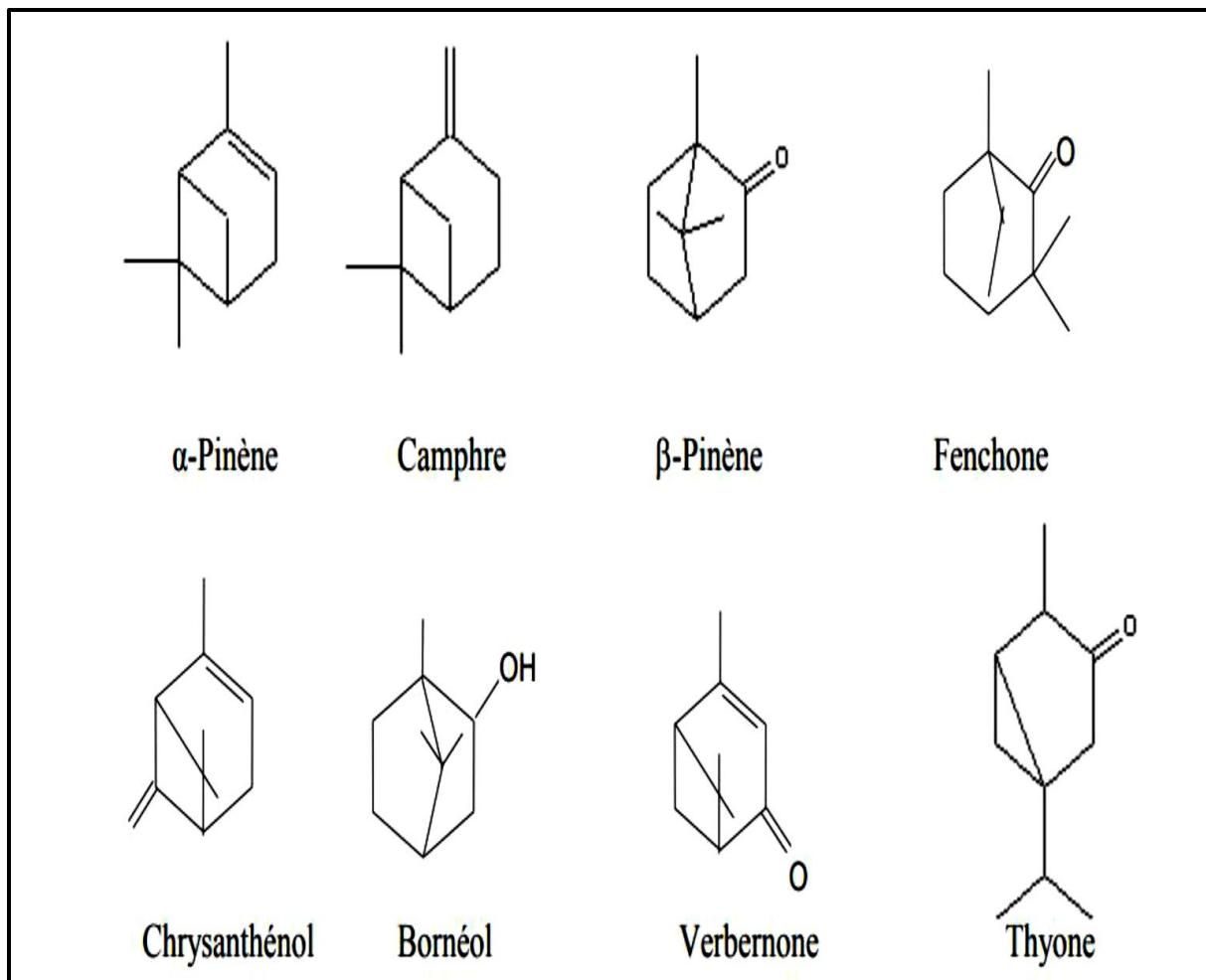


Figure 18. Structure de quelques Monoterpènes bicycliques (Bruneton, 1999).

III.2.1.3. Sesquiterpènes (Composés à C₁₅)

Les sesquiterpènes contiennent 15 atomes de carbone (Figure 18). Ils sont moins volatils et présentent des points d'ébullition plus élevés que les monoterpènes (Baser et Buchbauer, 2015). Ce sont des dérivés hydrocarbures de formule C₁₅.

Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurelles, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. La structure et la fonction des sesquiterpènes sont semblables à celles des monoterpènes Bakkali et al., (2008).

Environ 10000 sesquiterpènes naturellement sont présents dans l'ardoise de l'huile essentielle (Breitmaier, 2006); Jiang et al., (2016). Ils contiennent plus de 3000 molécules comme exemple : β -caryophyllène, β -bisabolène, α -humulène, α - bisabolol, farnesol (Labiod, 2016).

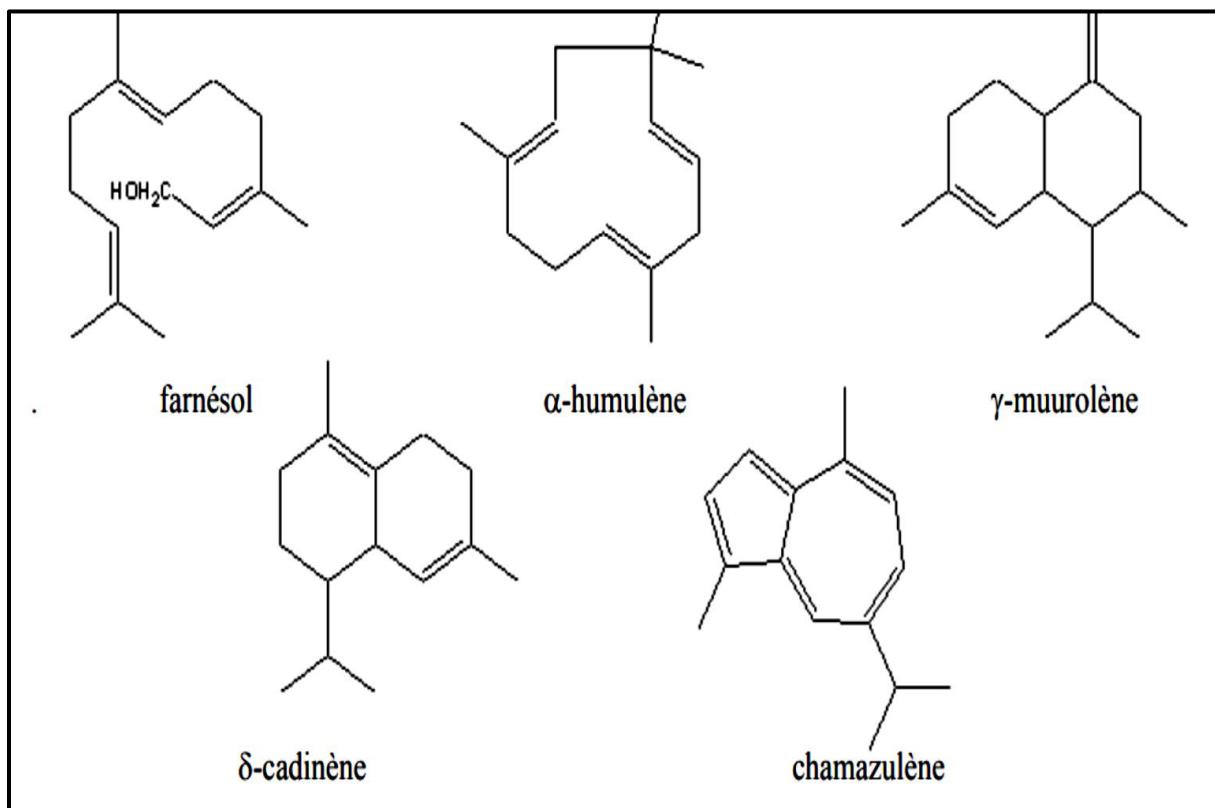


Figure 19. Structure de quelques sesquiterpènes (Bruneton, 1999).

III.2.1.4. Les diterpènes

Ce sont des terpènes formés par le couplage de quatre unités d'isoprènes, leur formule ($C_{20}H_{32}$), dont la masse moléculaire relativement importante limite leur présence dans les H.E donc sont peu fréquents. Ils sont obtenus par distillation et par entrainement à la vapeur d'eau (Pierron, 2014).

III.2.2. Composés aromatiques

Les composés aromatiques (Figure 19) dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) ou composés phénoliques, sont très souvent des allyles et des propényl phénols, parfois

des aldéhydes (**Labiod, 2016**). Ils sont beaucoup moins fréquents que les terpènes (**Dima, 2014**).

Comme on peut aussi rencontrer dans les HE des composés en (C₆-C₁) tels que la Vanilline ou l'Athranilate de Méthyle. Les lactones dérivées des acides cinnamiques, comme les coumarines, sont pour la plupart, entraînables par la vapeur d'eau et ainsi présentes dans certaines H.E (**Couic-Marinier et Lobstein, 2013**).

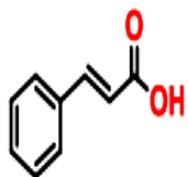
Ces composés aromatiques sont importants car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles d'où leurs importance sur le plan olfactif.

On peut citer, l'eugénol est responsable de l'odeur caractéristique du clou de girofle, l'anéthol de celle de l'anis, le cinnamate de méthyle et le méthylchavicol permettent de distinguer des chémotype intéressants au sein de l'espèce d'*Ocimum basilicum* (**Bruneton, 1999**). Ces composés sont abondants dans les huiles essentielles des Apiaceae (Anis, Fenouil, Cannelle, Basilic) (**Golmakani et Rezaei ,2008**).

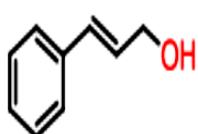
C'est pourquoi les effets des composés aromatiques sur le corps peuvent être assez remarquables, ce qui rend le soin d'utilisation essentiel **Shirley et al., (2011)**.

Aromatic compound

Cinnamaldehyde

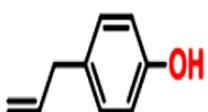


Cinnamyl alcohol



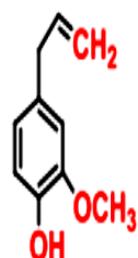
Phenol

chavicol

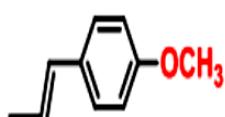


Phenol

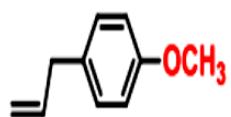
Eugenol

**Methoxy derivative**

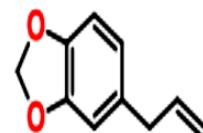
Anethole

**Methoxy derivative**

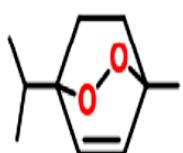
Estragole

**Methylene dioxy compound**

Safrole

**Terpenoides (Isoprenides)**

Ascaridole



Menthol

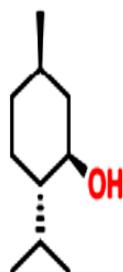


Figure 20. Exemples de la structure chimique de composés aromatiques Bakkali, et *al.*, (2008).

III.2.3. Composés d'origines diverses

Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles (composés issus de la dégradation des autres composés). Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits (**Bruneton, 1999**). Globalement ce sont des composés d'origine variée de faible masse moléculaire, entraînables lors de l'hydro distillation, sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée porteurs de différentes fonctions (**Ouis, 2015**).

- L'heptane et la paraffine dans l'essence de camomille.
- Des acides en C₃ et C₁₀.
- Des esters acycliques présents surtout dans les fruits : acétate de butyle (pomme), acétate d'isoamyle (banane).
- Des aldéhydes comme l'octanal et le décanal des Citrus ;
- Des alcools comme le 1-octèn-3-ol de l'essence de lavande,...

III.3. Les propriétés des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés (**Purchon, 2001**); (**Willem, 2002**) sont reconnues pour leurs propriétés médicinales nombreuses et variées, thérapeutiques elles agissent de manière remarquable dans la plupart des domaines de la santé et de la maladie. En outre, de nombreuses huiles essentielles présentent une activité contre tous les différents types de douleurs et sont très utilisées pour traiter les troubles articulaires inflammatoires **Wilson et al., (1997)**

La diversité moléculaire des composants qu'elles contiennent, leurs confère des rôles et des propriétés biologiques très variés (**Valnet, 1984**). Chaque huile essentielle ne possède pas qu'une action unique (**Mehani, 2015**). D'autres possèdent des propriétés digestives ou des propriétés antispasmodiques, sédatives, cicatrisantes. Ces activités sont dues surtout à leurs constituants terpéniques **Zambonelli et al., (1996)**.

Sachant que les hydrocarbures monoterpéniques présentent des propriétés antalgiques en usage percutané, vermifuge, emménagogue, antiseptique atmosphérique,

antiparasitaire. Les hydrocarbures sesquiterpéniques présentent des effets anti-inflammatoires, calmants, hypotenseur (**Amor ,2006**).

III.4. Les chémotypes

La connaissance des chémotypes d'une huile essentielle et leur comportement sont fondamentaux car ils permettent d'envisager l'activité pharmacologique, de prévoir aussi la pharmacocinétique et la biodisponibilité. Pour une même espèce botanique, la composition chimique de l'huile essentielle n'est pas immuable. Les huiles essentielles sont élaborées par les plantes aromatiques au sein des cellules sécrétrices. Leur élaboration est totalement tributaire du rayonnement solaire en l'absence duquel le rendement en produits aromatiques et leur nature sont affectés.

En sa présence, et tout particulièrement en fonction de la présence de tel ou tel rayonnement, les types de composants pourront varier considérablement au sein d'une même espèce. Par exemple, le basilic cultivé en pleine lumière à Madagascar a un taux de chavicol de 57% alors que la même plante cultivée à l'abri de la lumière en contient 74% (**Franchomme et Penoël , 1990**). Cette variabilité peut être influencée également par la composition du sol et la position géographique; le *Lippiamutiflora* récolté au Togo a révélé les chémotypes à citral, à thymol (acétate de thymyle), à para-cymène, à 1-8 cinéole (**Inouye et Abe ,2003**).

III.5. Biosynthèse des huiles essentielles

La biosynthèse des huiles essentielles se fait suivant deux principales voies (**Helander et al., 1998**).

III.5.1. Voie des Terpenoïdes

Le matériau de base est l'IPP (isopentylpyrophosphate), molécule à cinq atomes de carbones ayant une structure semi- alvéolaire. Il est dérivé de l'AcétylCoA (Carrefour important), lui-même issu du PEP (phosphoenolpyruvate) provenant directement du fructose.

La construction des squelettes hydrocarbonés a lieu de la même manière par la juxtaposition "tête à queue" d'unités isopréniques, unités pentacarbonés ramifiées assemblées enzymatiquement. Ainsi on trouve des squelettes hydrocarbonés à dix carbones (monoterpènes), puis à quinze carbones (sesquiterpènes) et plus rarement, à vingt carbones (diterpènes). Le processus peut se poursuivre mais dans d'autres buts que la synthèse des essences (**Hammer *et al.*, 2003**).

III.5.2. Voie des Phenylpropanoïdes

La synthèse des huiles essentielles par la voie des phenylpropanoïdes: commence par un métabolite du fructose, le PEP (phosphoenolpyruvate). Elle aboutit à un très grand nombre de substances aromatiques, via une série d'acides, dont l'acide shikimique (d'où son nom, voie shikimique) et l'acide cinnamique. Les métabolites terminaux, importants en thérapeutique, sont les acides aromatiques suivants : acide salicylique, cinnamique et benzoïque et leurs esters dont le salicylate de méthyle, les cinnamates, les benzoates, certains phénols (eugénol) ainsi que les coumarines,...

Quelques grandes familles chimiques de molécules non volatiles, comme les tannoïdes et les flavonoïdes, se trouvent incluses dans cette voie (**Faleiro *et al.*, 2003**).

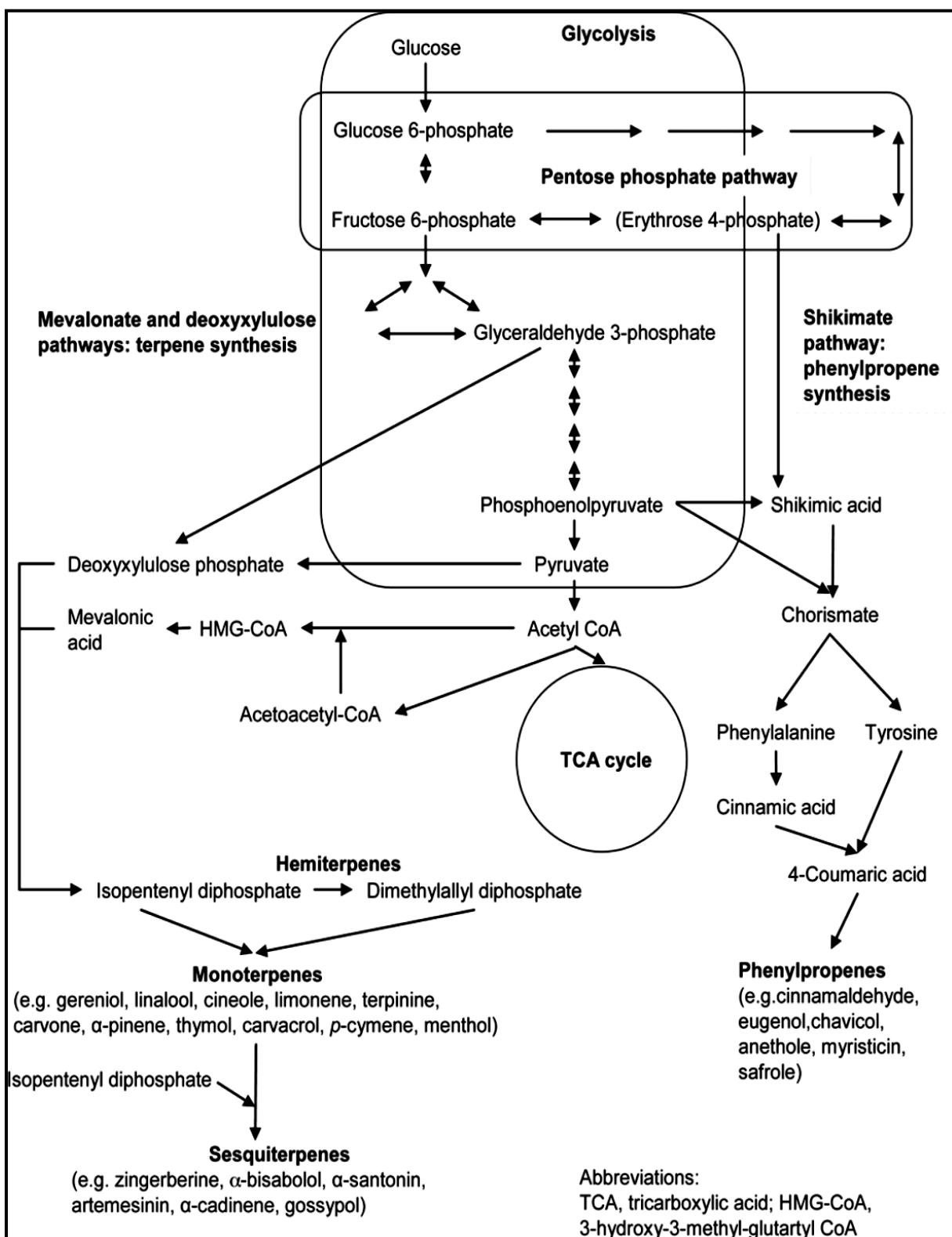


Figure 21. Voies responsables de la synthèse de terpènes et phenylpropènes, les principaux métabolites présents dans les huiles essentielles des plantes (Benchaar et Greatherd, 2011).

III.6. Mécanisme d'action antimicrobienne des H.Es

Des remèdes traditionnels à base de plantes ont été longtemps employés sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques (**Parekh et Chanda, 2007**). La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (**Guinoiseau, 2010**).

Ces huiles essentielles possèdent un large spectre d'action, elles agissent contre une grande variété de bactéries, y compris celle qui développent des résistances aux antibiotiques. En outre, les mécanismes par lesquels les huiles essentielles exercent leur activité antibactérienne sont peu connus, mais il y a un certain nombre de mécanismes proposés (**Holley et Patel, 2005**).

Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**Kalemba et Kunicka, 2003**). Les mécanismes de l'activité antibactérienne sont basés sur plusieurs théories. La composition complexe des huiles essentielles tend à prouver que cette activité serait due à plusieurs mécanismes d'action différents, liés à la nature chimique de ces composés **Skandamis et al., (2001); Carson et al., (2002) ; (Burt, 2004)**.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles présente deux sortes d'effets sur ces microorganismes : Effet bactéricide (exerçant une activité mortelle) et effet bactériostatique (entrant inhibition de la croissance). Ils sont utilisés dans la chimiothérapie et dans le traitement de plusieurs types de cancer **Manach et al., (2004)**.

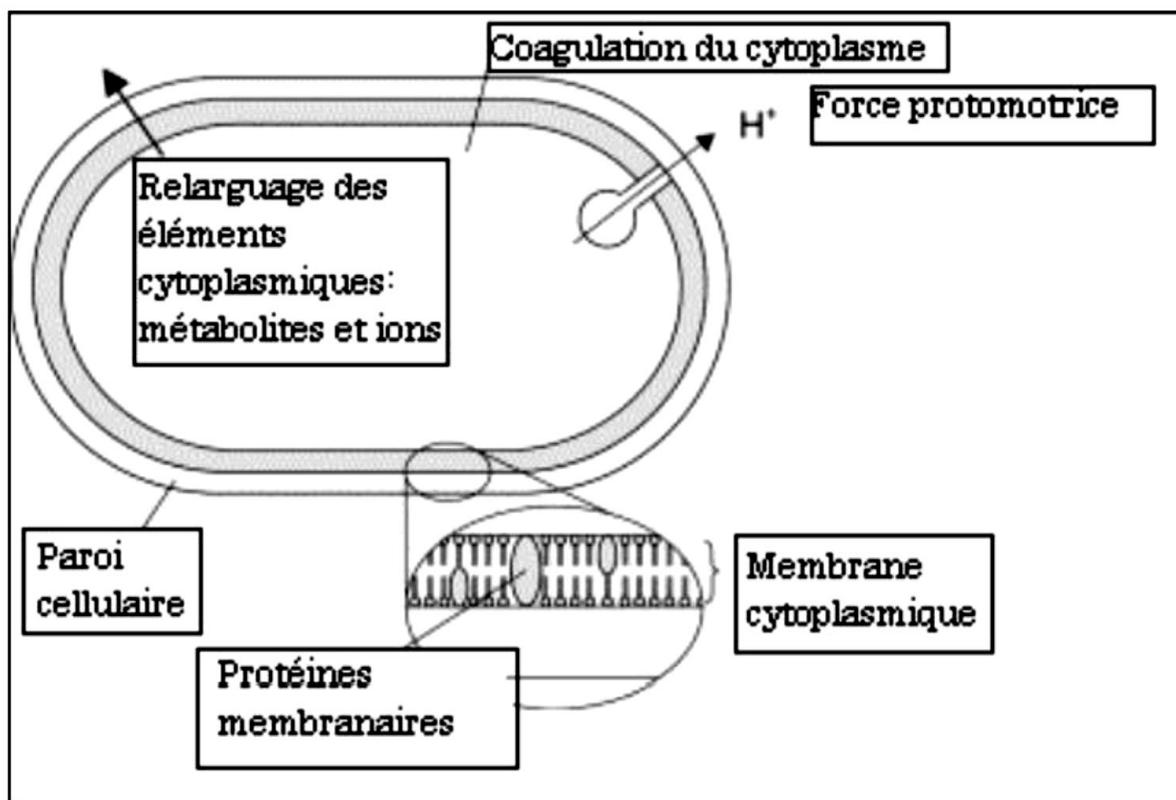


Figure 22. Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (Dorman et Deans, 2000); Ultee et al., (2002).

Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) Ulanowska et al., (2007). Les molécules aromatiques possédant l'activité antibactérienne la plus importante sont les phénols contenus par exemple dans l'huile essentielle de Clou de girofle (Purchon, 2001) ; (Willem, 2002).

Comme, ont pu déterminer l'activité antimicrobienne de différentes huiles essentielles (Thym, Citronnelle, Genévrier, Origan, Sauge, Fenouil, Romarin, Menthe, Églantier, Aneth) sur certaines bactéries pathogènes et d'altération, isolées de la surface de divers légumes frais (**György, 2020**). Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools (α -terpinéol, terpinène-4-ol et linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les terpènes **Cosentino et al., (1999); (Dorman et Deans, 2000)**.

D'autre part l'action des huiles essentielles sur le développement des micro-organismes peut être expliquée par l'altération de la perméabilité membranaire des germes en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie **Sikkema et al., (1995); (Chami, 2005); Oussalah et al., (2006); Souza et al., (2006)**.

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Carson et al., 2002**). Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles ait son propre mécanisme d'action. Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (**Cox et al., 2000; Carson et al., 2002**).

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.

- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (**Daferera et al., 2003**).

III.7. Activités antifongiques

Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons : *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum* (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

Le pouvoir antifongique est attribué aussi à la présence de certains groupements fonctionnels chimiques dans la composition des huiles essentielles, les travaux de **Benjilali et al. (1986)** ont enregistrés le pouvoir antifongique de 26 huiles essentielles testées huile essentielle de l'armoise blanche, de thym, d'eucalyptus et de romarin.

L'huile essentielle du thym s'est révélée le plus active sur les 37 souches de moisissures étudiées, suivie de l'armoise blanche, celle du romarin et de l'eucalyptus étant les moins efficaces.

*Etude
expérimentale*

Chapitre I

Matériels et méthodes

Dans cette partie expérimentale nous avons présenté les deux axes de recherche.

➤ Le premier axe, est consacré à nous avons fait les analyses suivantes :

- L'extraction des huiles essentielles des feuilles de *Peganum harmala*.

- L'étude de composition chimique de l'huile essentielle extraite.

- Caractérisation des huiles essentielles de la *Peganum harmala* par méthode chromatographique en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC-SM) à l'université de Mascara.

➤ Dans le deuxième axe, l'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles de cette espèce végétale.

➤ Doking moléculaire.

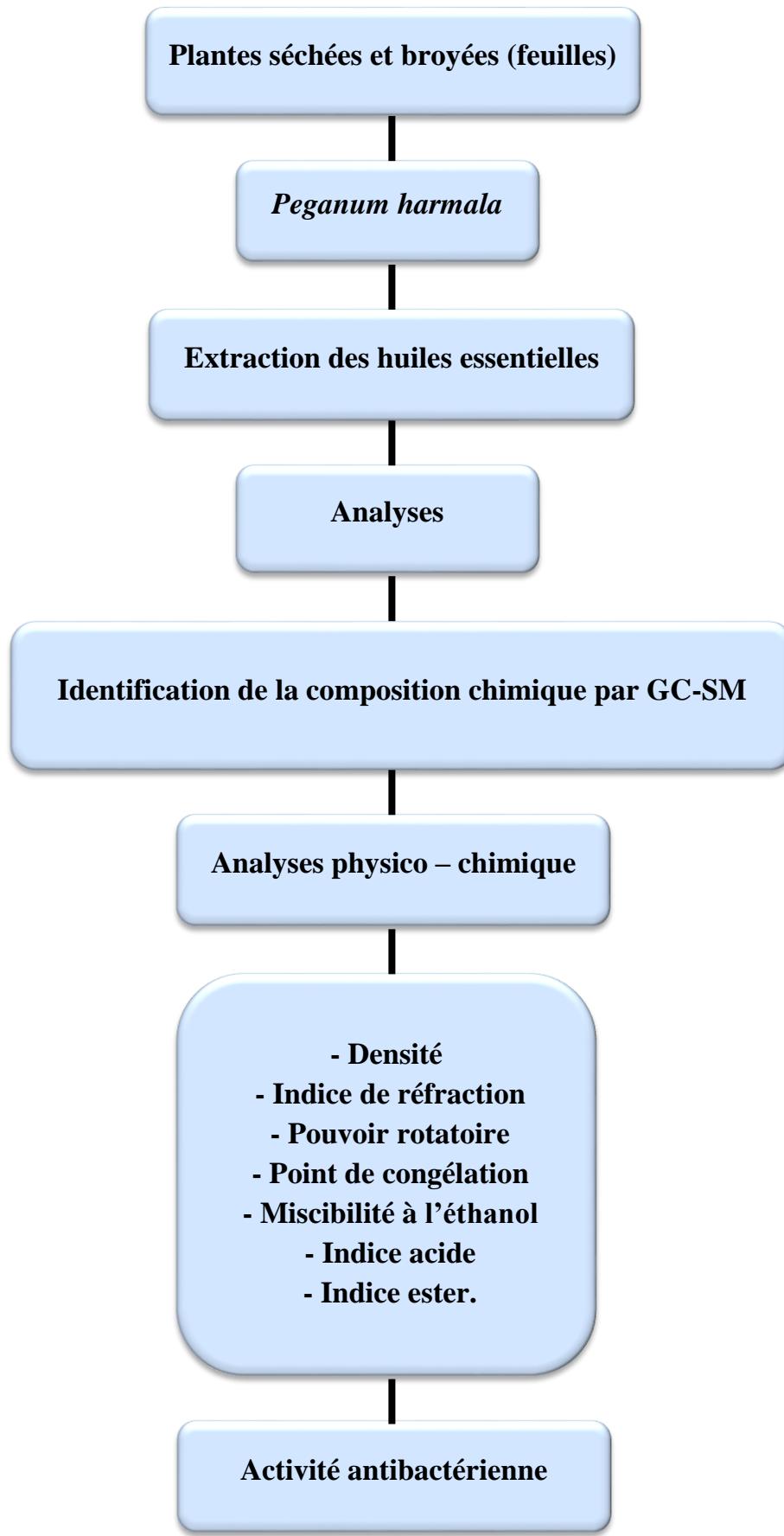


Figure 23. Plan général de la partie expérimentale.

I.1. Matériel végétale et extraction des huiles essentielles

I.1.1 Matériels végétale

Les feuilles de *Peganum harmala* sont récoltées durant le mois d'avril 2021, période de maturation, dans la région de Bougtob de Wilaya de El Bayadh, située au sud-est d'Oran et au sud-ouest d'Alger (avril 2021), qui se caractérise par un climat semi- aride froid, la température moyenne est de 14.2°C et la moyenne de précipitation annuelle ne dépasse pas 300 mm, il est neige souvent en hiver à cause de l'altitude.

La 2^{eme} région Mechria wilaya de Naâma, située dans l'ouest algérien, elle est considérée comme l'un des carrefours qui relient le sud algérien à l'Oranie, qui se caractérise par un climat semi-aride, La température moyenne est de 15.8 °C et la moyenne des précipitations annuelles ne dépasse pas 300 mm (avril 2021).

L'identification botanique de l'espèce a été faite sur la base de la description des caractéristiques morphologiques de la plante (**Maire, 1933 ; Chopra et al., 1960 ; Ozanda, 1991 ; Bruneton, 1999**) et a été confirmées par le professeur Monsieur RIGHI K (enseignant botaniste à l'université de Mustapha Stambouli –Mascara). Les feuilles on est séché, et conservé à la température ambiante du laboratoire à l'abri du soleil.



Figure 24. Les feuilles de *Peganum harmala* L.

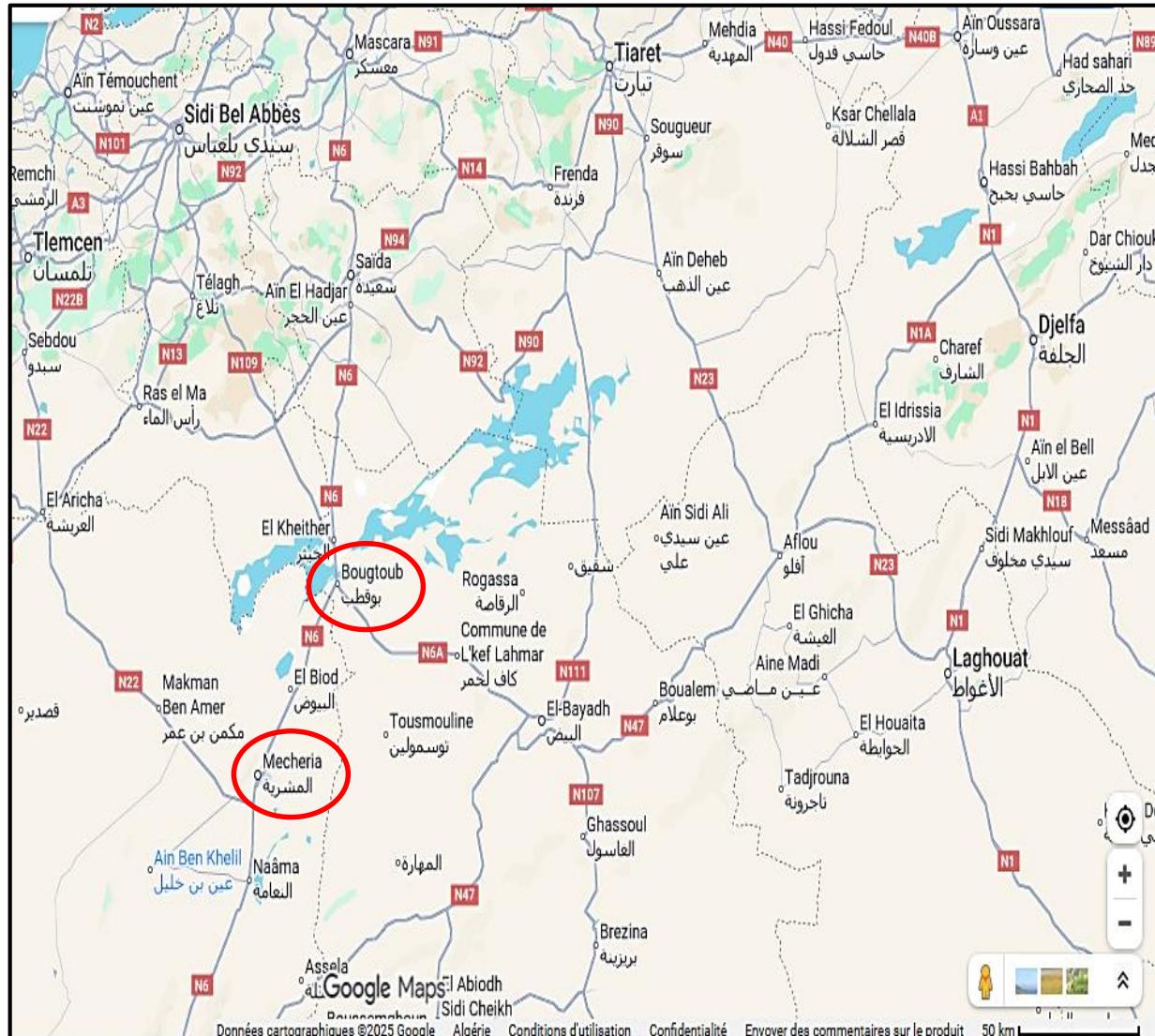


Figure 25. Carte géographique représentant les sites de récolte de *P.harmala*.

Tableau 07. Les caractéristiques géographiques et bioclimatiques des sites de récolte.

Plante	Station	Latitude	Longitude	Altitude	Etage bioclimatique
	Bougtob	34°08'36" N	0°04'24" E	998 m	Semi-aride froid
<i>P. harmala</i>	Mechria	33° 33' 00" N	0° 17' 00" E	1167 m	Semi-aride

I.1.2. Matériels microbiologique

Pour les tests in vitro, cinq souches bactériennes et deux champignons ont été fournies par l'American Type Culture Collection (ATCC) dont un antibiogramme a été réalisé pour vérifier leur profil d'antibioresistance :

- ✓ Deux souches à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC2592, *Bacillus cereus* ATCC 11778.
- ✓ Trois souches à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Escherichia coli* ATCC25922.
- ✓ Champignon : *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.
- ✓ Levure : *Candida albicans* ATCC 30031.

I.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par le procédé d'hydro distillation dans un appareil de type Clevenger (**figure 26**), 100 g de la plante est introduit dans un ballon contenant 500 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement. Après condensation, l'huile est séparée par décantation. Pour éviter toute dégradation par l'air ou la lumière, nous avons conservé les H.Es à 4°C.

Ajouter du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) pour éliminer toute trace d'eau. Le sulfate de sodium anhydre a la capacité d'absorber l'humidité et d'éliminer toute la quantité d'eau et à l'obscurité jusqu'à son utilisation. L'extraction a été réalisée au

Laboratoire de Bioconversion, d'Ingénierie Microbiologique et de Sécurité Sanitaire, Faculté SNV, Université Mustapha Stambouli - Mascara, Algérie.

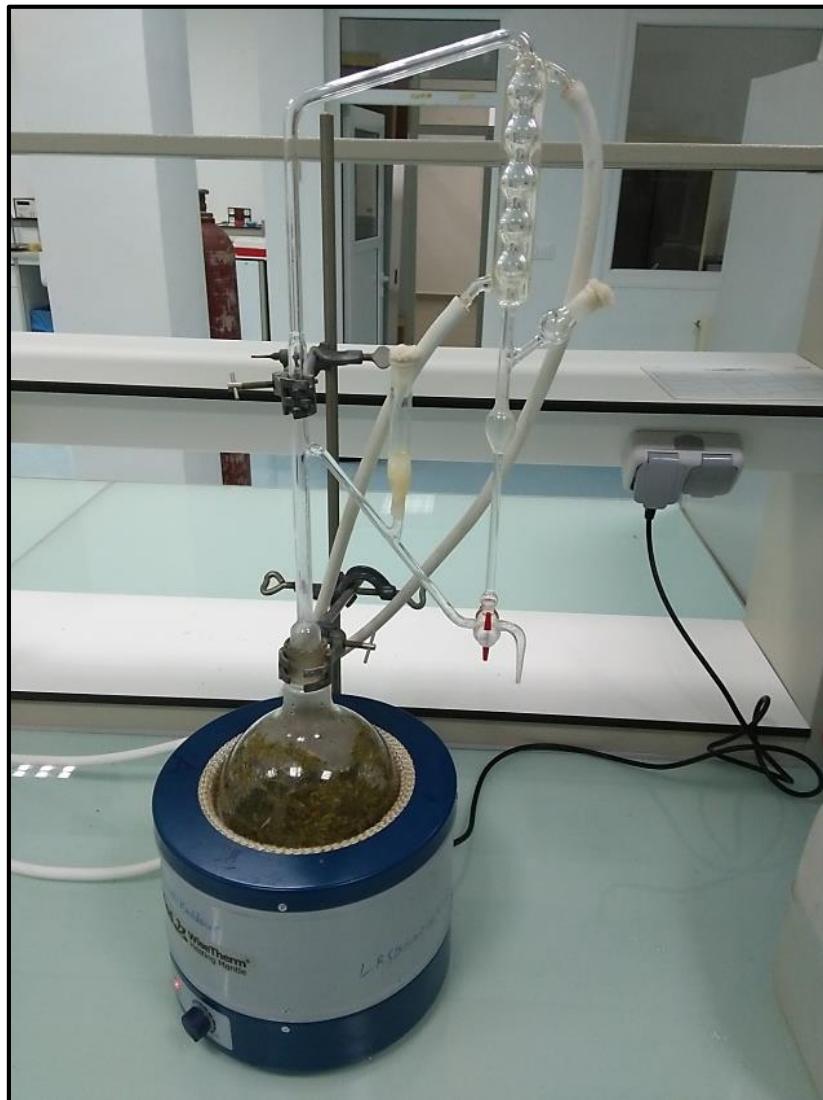


Figure 26. Montage de clevenger.

Le rendement en HE est calculé selon la formule suivante :

$$R = (m / m_0) * 100$$

R : le rendement en huiles essentielles en pourcentage

m : masse d' huiles essentielles récupérées (g)

m_0 : poids du matériel végétal (g).

I.3. Caractérisation d'huile essentielle de *Peganum harmala*

I.3.1. Caractères sensorielles et indices physicochimiques

Les huiles essentielles doivent répondre à des caractéristiques analytiques qui sont établies par des normes internationales. Pour connaitre la qualité de l'huile essentielle de *Peganum harmala*, nous avons procédé à des essais sensoriels et à des mesures de quelques indices physicochimiques.

I.3.2. Caractéristiques sensorielles (AFNOR NF ISO 280 : 1999)

- **La couleur** : C'est un paramètre très important. Elle est déterminé à l'œil nu.
- **L'odeur** : Mélanger 3 gouttes d'huile essentielle avec 5 ml d'alcool à 90%. Puis, ajouter 10 g de saccharose pulvérisé. L'odeur est semblable à celle de la plante à partir de laquelle l'huile essentielle est obtenue.
- **L'aspect** : Observation visuelles des H.Es (lumineux, visqueuse...)

I.3.3. Indice physico-chimique d'huile essentielle étudiée

I.3.3.1. Propriétés physiques

Pour obtenir des données sur la composition et le degré de pureté des huiles essentielles et, dans certains cas, pour l'identifier, on procède à l'étude de ses propriétés physiques et chimiques.

Les méthodes physiques d'examen pour l'analyse des huiles essentielles s'attachent surtout à la détermination de la densité, du point de congélation, la densité relative, l'indice de réfraction, la miscibilité à l'éthanol, et sur le pouvoir rotatoire (Afnor ; 2000).

I.3.3.2. Mesure du pH

Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre.

I.3.3.3. La densité relative (Afnor NFT 75.111.2000)

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20 °C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C. Brièvement, à l'aide d'un pycnomètre de capacité de 5 ml, on pèse successivement des volumes égaux d'huile essentielle et d'eau

distillée à la température ambiante (20°C). On remplit le pycnomètre avec de l'eau distillée récemment bouillie, puis refroidie aux environs de 25°C. On plonge le pycnomètre dans un bain marie, jusqu'à équilibre de la température aux environs de 20°C et on le retire .Après essuyage, on pèse le pycnomètre, en remplaçant l'eau par l'huile essentielle.

La densité relative est donnée par la formule :

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Où :

m_0 : est la masse en gramme du pycnomètre vide ;

m_2 : est la masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile essentielle ;

m_1 : est la masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau distillée ;

Si on désire obtenir la masse volumique des huiles essentielles, il faut multiplier la densité relative par la masse volumique de l'eau m (eaux) = 0.99823 g/ml (**Afnor ; 2000**).

I.3.3.4. L'indice de réfraction (Afnor NFT 75 - 112-2000)

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et celui de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'ondes déterminée, passant de l'air à l'huile essentielle maintenue à une température constante.

La longueur d'onde spécifiée est $\lambda = 589 (\pm 0,3)$ nm, correspondant aux radiations D₁ et D₂ du spectre du sodium.

Mode opératoire

- ✓ Nettoyer la lame du réfractomètre en utilisant de papier de joseph avant et après chaque utilisation ;
- ✓ Etalonner le réfractomètre avec des produits étalons.

- ✓ La température de référence étant de 20 °C doit être maintenue durant les lectures effectuées.
- ✓ Déposer quelque goutte de l'huile essentielle sur le prisme du réfractomètre et régler le cercle de chambre sombre et claire dans la moitié. Effectuer la lecture en tenant compte de la température.



Figure 27. Réfractomètre d'Abbe.

$$ID_{20} = I + 0,0004 (T - 20 \text{ } ^\circ\text{C})$$

I.3.3.5. Le pouvoir rotatoire (Afnor NFT 75 - 113-2000)

On définit le pouvoir rotatoire α_D comme étant l'angle exprimé en milliradians ou en degrés d'angle, dont tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde $(589,3 \pm 0,3)$ nm, correspondant aux raies D du sodium, lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100 mm de l'huile essentielle dans des conditions déterminées de température.

La détermination du pouvoir rotatoire des huiles essentielles consiste à mesurer leur capacité à dévier la lumière soit dans la partie droite (Dextrogyre), soit dans la partie gauche (Lévogyre).



Figure 28. Polarimètre de Laurent.

Mode opératoire

Etalonné le polarimètre et ceci en remplissant le tube avec de l'eau distillée , en assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée puis lire l'angle de rotation .Après nettoyage et séchage, remplir le même tube avec l'huile essentielle . Après 10 à 15 min, l'angle de rotation du plan de polarisation des raies D du sodium est lu lorsque l'équilibre entre les plages claires et plages sombres est atteint. Ainsi, la valeur de l'angle de rotation sur le

plan est lue sur l'oculaire de l'appareil.

Le pouvoir rotatoire exprimé en degrés d'angle est donné par la formule suivante :

$$[\alpha]^{20} d = \alpha / L * C$$

Où

α : La valeur lue sur l'appareil en degrés d'angle.

L : L'épaisseur du film (cellule) en dm.

C : La concentration de l'essence exprimée en (g/100 ml). (**Afnor ; 2000**)

I.3.3.6. La miscibilité à l'éthanol (Afnor 75-101,2000)

Une huile essentielle est dite miscible à V volume et plus de l'éthanol de titre alcalimétrique déterminé à la température de 20°C, lorsque le mélange de 1 volume de l'huile essentielle avec V volumes de cet éthanol est limpide, et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre jusqu'à un total de 20 volumes.

Brièvement, on additionne graduellement à une prise d'essai d'huile essentielle à la température de 20°C de l'éthanol de titre alcoométrique convenable, puis on évalue leur miscibilité en agitant énergiquement pendant l'addition du solvant. Lorsque la solution obtenue est parfaitement limpide, on note le volume (V) de dilution d'éthanol utilisé puis on poursuit l'addition de solvant par fractions de 0.5 ml jusqu'à un total de 20 ml en agitant après chaque addition.

La miscibilité des huiles essentielles à l'éthanol de titre t, à la température de

20°C, est exprimée par :

Un volume d'huiles essentielles dans V volumes d'éthanol de titre t. (**Afnor ;2000**)

I.3.3.7. Le point de congélation (Afnor 75-111,2000)

Le point de congélation d'une huile essentielle est la température constante ou maximale observée pendant la phase de la libération de la chaleur de solidification, lorsque cette

huile essentielle à l'état liquide est refroidie.

L'huile essentielle est mise dans des tubes à essais à l'intérieur d'un congélateur, accompagnés d'un thermomètre, d'où l'observation des variations de température accompagnant la solidification de l'huile qui est refroidie lentement et progressivement. (Afnor ; 2000)

I.3.4. Propriétés chimiques

I.3.4.1. Détermination de l'indice d'acide (Afnor - NFT - 60 -2000)

La détermination de l'indice d'acide renseigne généralement sur le degré d'hydrolyse. Les huiles essentielles ne contiennent pas ou très peu d'acides gras libres à courte chaîne carbonique. Ce paramètre est une variable qui dépend essentiellement des conditions de conservation et surtout des conditions d'extraction.

Il y a deux manières d'exprimer la teneur d'une matière grasse : l'acidité et l'indice d'acide. Ces deux caractéristiques d'une même propriété sont mesurées de la même façon. Seuls les résultats du dosage sont exprimés différemment.

On pèse 2 g d'huile essentielle qu'on introduit dans une fiole où on ajoute 5 ml d'éthanol à 95%. Agiter et procéder au titrage avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée ($C (KOH) = 0.1 \text{ mol/l}$), en présence de phénolphtaléine (indicateur coloré), à la température ordinaire (25°C). La couleur jaune clair du liquide (la couleur de l'huile essentielle) vire à la neutralisation vers une couleur rose qui persiste quelques minutes avant de reprendre la couleur initiale. Le volume de KOH qui a servi à la neutralisation est lu directement sur la burette.

L'indice d'acide est exprimé par la formule :

$$I_A = (5,61 * N * V) / m$$

5,61 : Correspond à 0.1 mol/l de KOH.

N : normalité de KOH.

V : Volume en ml de la solution éthanolique de KOH utilisée pour le titrage.

m : Masse en grammes de l'huile essentielle. (Afnor ; 2000).

I.3.4.2. Indice d'ester (NFT 75 104, 1982)

L'indice d'ester est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides libres par l'hydrolyse des esters présents dans 1 g de substance.

Mode opératoire

Cette détermination est effectuée sur la solution provenant de la détermination de l'indice d'acide. Ajouter 25 ml de la solution d'hydroxyde de potassium. Adapter le réfrigérant à reflux au ballon et le placer ensuite sur le manteau chauffant qui sera maintenu sur le ballon pendant une heure.

Laisser ensuite refroidir le ballon et démonter le tube. Ajouter 20 ml d'eau et quelques gouttes de solution de rouge de phénol .Titrer l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique. En parallèle, effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions mais en prenant soin d'ajouter au préalable 5 ml d'éthanol neutralisé (ce volume correspond au volume introduit lors de la détermination de l'indice d'acide).

I.4. Analyse des huiles essentielles par chromatographie phase gazeuse CPG

I.4.1. Conditions opératoire

Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse, au niveau duquel ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (IR) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres (Adam, 2001).

I.4.2. Identification des constituants

L'identification des constituants est réalisée par l'utilisation des indices de rétention sur colonne polaire et apolaire. L'identification des composants individuels est fondée sur la comparaison des indices de rétention (IR) calculés, sur les colonnes polaires et apolaires, avec ceux de composés authentiques ou des données de la littérature (**König et al., 2001; NIST, 2005**) et des bibliothèques commerciales (**Adam, 2001; König et al., 2001**).

L'analyse des huiles essentielles a été effectuée dans le laboratoire de Physique et Chimie des Macromolécules et Interfaces Biologiques Université Mustapha Stambouli - Mascara, Algérie.

I.4.3. Spectrométrie de masse SM

Les constituants volatils de l'huile essentielle ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse spectromètre de masse « Shimadzu » GCMS-TQ8030 avec une colonne capillaire en silice Stabilwax (30 m x 0,32 mm, épaisseur du film, 0,25 µm). Température maximale 350 °C. Le gaz vecteur était l'hélium, température du four à colonne 50 °C, température d'injection 220 °C à une vitesse de 5 °C/min, temps d'équilibre 3 min, capacité du flacon 1,5 ml, capacité de la seringue 10 µl. (dilué dans l'hexane).

L'identification des composants était basé sur la comparaison de leur masse spectres avec ceux de la bibliothèque spectrale de masse du NIST (**NIST, 2002**) et ceux décrits par Adams en 2007 ainsi que sur la comparaison de leurs indices de rétention soit avec ceux composés authentiques ou ayant des valeurs littéraires (**Adams, 2007**).

L'identification des composés a été réalisée par comparaison de leurs spectres de masse et de leurs KI (Indice de Kovats) avec ceux des bases de données (**Adams, 2007**) et celle établie par le laboratoire d'accueil. Pour que l'identification soit convenable, les principes suivants qui découlent des propriétés des colonnes (**Adams, 2007**). L'indice de rétention linéaire est défini par la formule suivante :

$$KI = 100n + (TR(A) - TR(Cn)) / (TR(Cn+1) - TR(Cn)) \times 100$$

KI : Indice de rétention.

A : composé inconnu.

TR(A) : temps de rétention du composé inconnu

TR(C_n) : temps de rétention de l'hydrocarbure à n atomes de carbone précédant immédiatement le composé

TR (C_n+1) : temps de rétention de l'hydrocarbure à (n + 1) atomes de carbone suivant immédiatement le composé ; Les indices expérimentaux sont comparés à ceux de la littérature ainsi qu'à ceux des banques de données du laboratoire pour confirmation.



Figure 29. Chromatographie phase gazeuse couplée avec spectre de masse.

I.5. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles des feuilles *Peganum harmala* in vitro

Pour évaluer l'activité antimicrobienne, nous avons utilisés deux méthodes différentes :

- La méthode de diffusion de disque
- La méthode de microdilution en milieu liquide pour déterminer les CMI.

Les tests antimicrobiens ont été effectués sur des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC), gracieusement fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie. Ces souches ont été choisies pour leur haute pathogénicité et leur multi résistance. Les bactéries sont des espèces Gram négatif ou Gram positif pathogènes. Il s'agit des souches suivantes :

- Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC2592, *Bacillus cereus* ATCC 11778.
- Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Escherichia coli* ATCC25922.

Les souches bactériennes ont été conservées à la température ambiante dans des tubes contenant 3 mL de milieu incliné (gélose de conservation).

- Levure : *Candida albicans* ATCC 30031.
- Champignon : *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Tableau 8. Les microorganismes utilisés pour évaluer l'activité antimicrobienne des H.Es.

	Microorganisme	Gram	Code ATTC	Source
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	positif	2592	
	<i>Bacillus cereus</i>		11778	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		27853	l'Institut Pasteur d'Algérie
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	négatif	700603	
	<i>Escherichia coli</i>		25922	
Levure	<i>Candida albicans</i>		30031	
Champignon	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		16404	

I.5.1. Vérification de la pureté des bactéries et identification des souches

La vérification de la pureté des bactéries et leur identification se fait par l'étude de leurs caractères morphologiques et biochimiques.

I.5.1.1. Identification des bactéries

➤ Morphologique et coloration

a-Aspet des colonies.

b-mobilite à l'état frais.

c-coloration de Gram (voir Annex).

➤ Caractéristiques biochimiques

Nous avons utilisé des plaques API 20 E pour les entrobactéries et les *Pseudomonas aeruginosa* et API STAPH pour le *Staphylococcus aureus*.

I.5.1.1.1. Principe

Les galeries API Staph et API 20 E sont des systèmes standardisés pour l'identification du genre *Staphylococcus* et des *Enterobacteriaceae*, respectivement. Elles comprennent

des tests biochimiques miniaturisés et se présentent sous forme de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests sont reconstitués en inoculant les microtubes avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph medium pour les staphylocoques ou dans l'eau physiologique stérile pour les entérobactéries.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

I.5.1.1.2. Technique

Une suspension bactérienne préparée et standardisée à l'échelle 0.5 McFarland est inoculée dans la galerie en remplissant les microtubes uniquement, les microtubes et les cupules pour les tests encadrés et en ajoutant l'huile de paraffine dans les cupules pour les tests soulignés. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24heures.

I.5.1.1.3. Lecture et identification

Après incubation, la lecture des profils biochimiques a été faite en se référant aux tableaux de lecture de la galerie API 20E et la galerie API Staph, puis l'identification des profils numériques a été réalisée à l'aide d'un logiciel ApiwebTM.

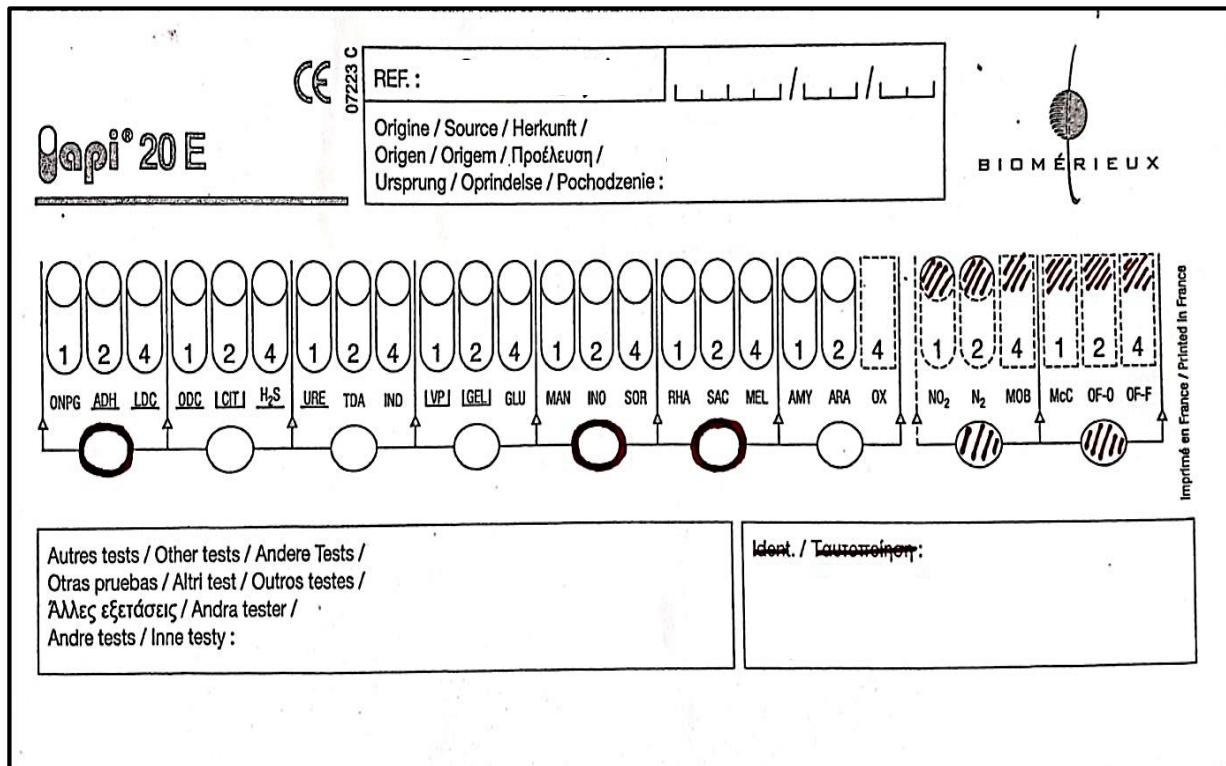


Figure 30. Galerie API 20 E.

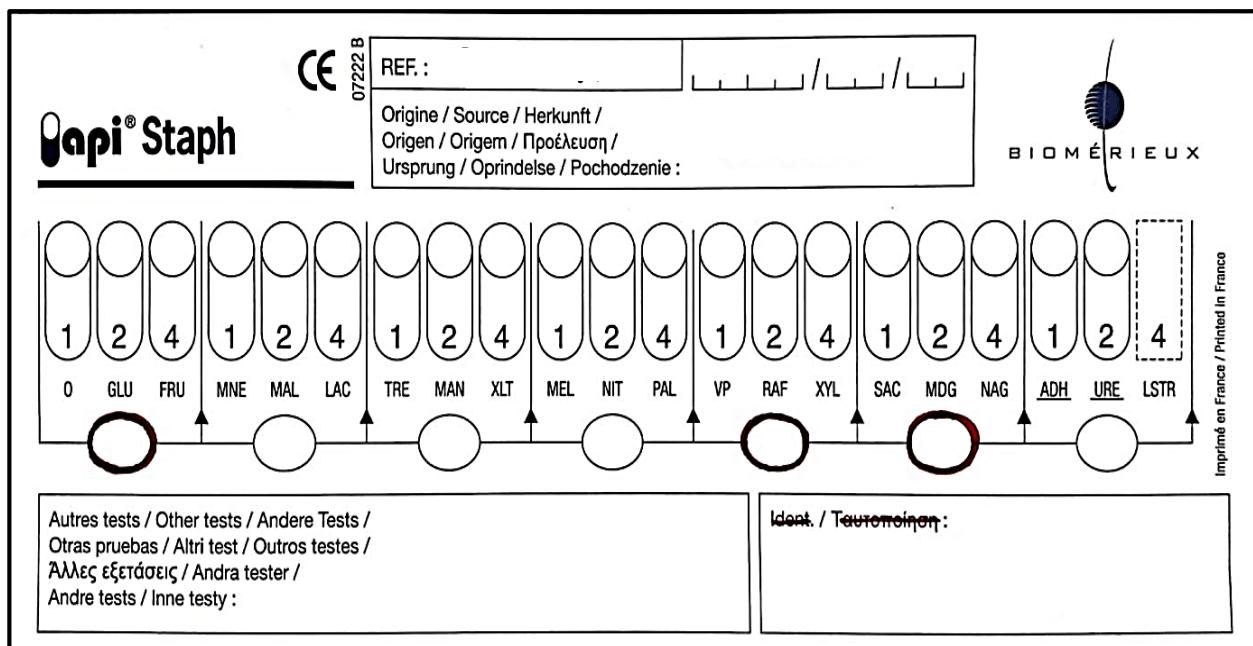


Figure 31. Galerie API Staph.

Tableau 9. Tableau de lecture de la galerie API 20 E.

TABLEAU DE LECTURE					
TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>ODC</u>	L-omithine	1,9	Omithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>CIT</u>	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
<u>H2S</u>	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incolore / grisâtre	dépot noir / fin liseré
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	jaune	<u>TDA / immédiat</u> marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	incolore vert pâle / jaune	<u>JAMES / immédiat</u> rose
<u>VP</u>	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	incolore / rose pâle	rose / rouge (5)
<u>GEL</u>	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAmnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARAbinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXydasé	(voir notice du test oxydase)	

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.
(2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 H d'incubation doit être considérée négative.
(3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).
(4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.
(5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

Tableau 10. Tableau de lecture de la galerie API Staph.

TABLEAU DE LECTURE				07468J · fr · 2009/04	
TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				NEGATIF	POSITIF
0	Aucun		Témoin négatif	rouge	—
GLU	D-glucose	1,56	(Témoin positif) (D-GLUcose)		
FRU	D-fructose	1,4	acidification (D-FRÜctose)		
MNE	D-mannose	1,4	acidification (D-ManNose)		
MAL	D-maltose	1,4	acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)	rouge *	jaune
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (D-MANnitol)		
XTL	xylitol	1,4	acidification (XyLiTol)		
MEL	D-mélibiose	1,32	acidification (D-MELibiose)		
				<u>NIT 1 + NIT 2 / 10 min</u>	
NIT	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITrates en nitrites	incolore-rose pâle	rouge
				<u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u>	
PAL	β-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	jaune	violet
				<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
VP	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	incolore-rose pâle	violet-rose
RAF	D-raffinose	1,56	acidification (RAFFinose)		
XYL	D-xylose	1,4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1,32	acidification (SACcharose)		
MDG	méthyl-α-D- glucopyranoside	1,28	acidification (Méthyl-α-D- Glucopyranoside)	rouge	jaune
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
ADH	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet

Les tests d'acidification doivent être lus comparativement aux témoins négatif (0) et positif (GLU).

- * Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs.
- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peplones.

I.5.1.2. Préparation des précultures

Les souches sont ensemencées par stries dans un milieu de gélose nutritive, après incubation 18h à 37°C, trois colonies bien isolées sont prélevées et émulsionnées dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% NaCl à l'aide d'un vortex ensuite on fait des dilutions afin de standardiser la suspension bactérienne. L'inoculum est ajusté à 0.5 Mc Farland correspondant à une densité optique de (0.08 à 0.10) à 625 nm. La concentration finale de l'inoculum est de 10^6 à 10^8 germes.mL⁻¹ pour les bactéries, et une concentration de 10^7 cellules.mL⁻¹ pour les levures (CLSI., 2006; Noumi *et al.*, 2011).

I.5.1.3. Préparation des concentrations des huiles essentielles

Les concentrations efficaces à effet antimicrobien des HEs de *Peganum harmala* appliquées dans cette étude sont choisies d'après des essais préliminaires en utilisant une série de concentrations croissantes préparées par dilutions binaires.

Pour solubiliser les extraits, nous avons utilisés le dimethyl sulfoxyde (DMSO) à 10% (n'exerce aucun effet antimicrobien). Ainsi, la stérilisation des solutions préparées est assurée par une filtration à l'aide des filtres stérile, de porosité de 0.22 µm dans des conditions d'asepsie afin d'éviter les contaminations extérieures.

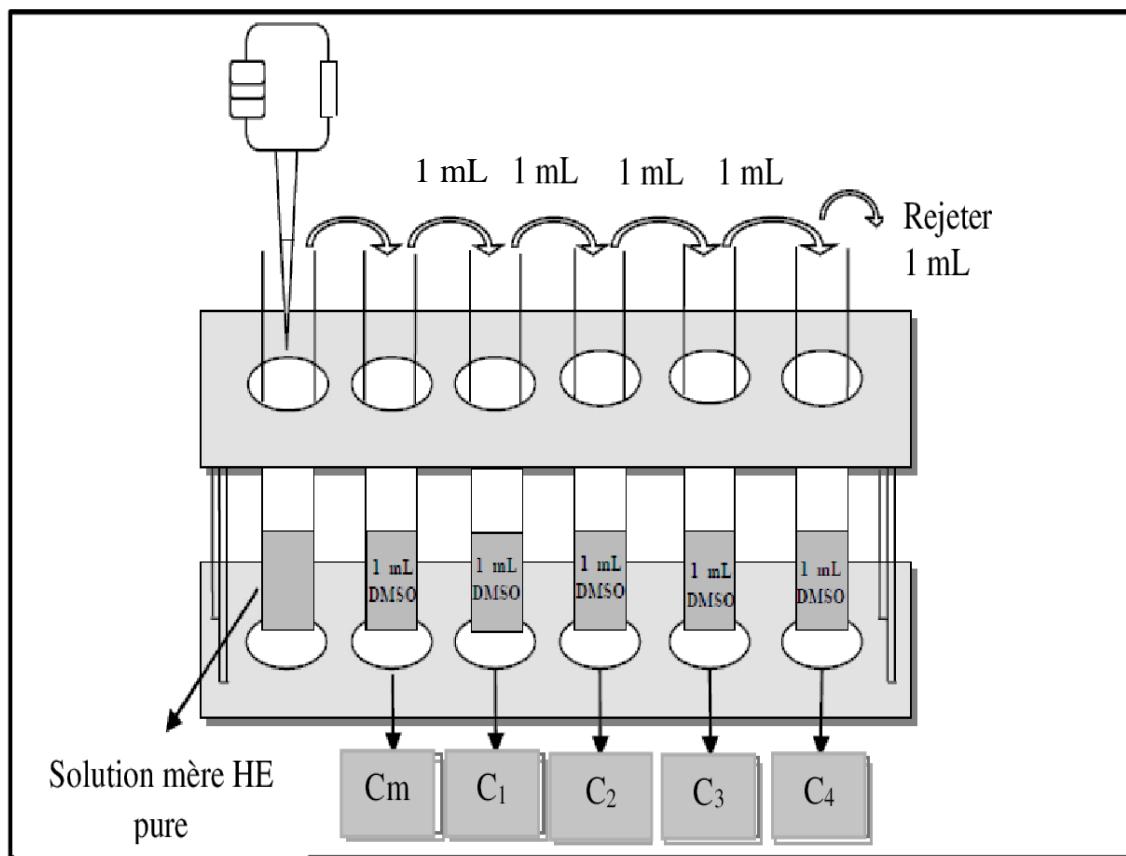


Figure 32. Protocole expérimentale pour la préparation des concentrations en huiles essentielles par dilutions binaires (**Sanogo *et al.*, 2016**).

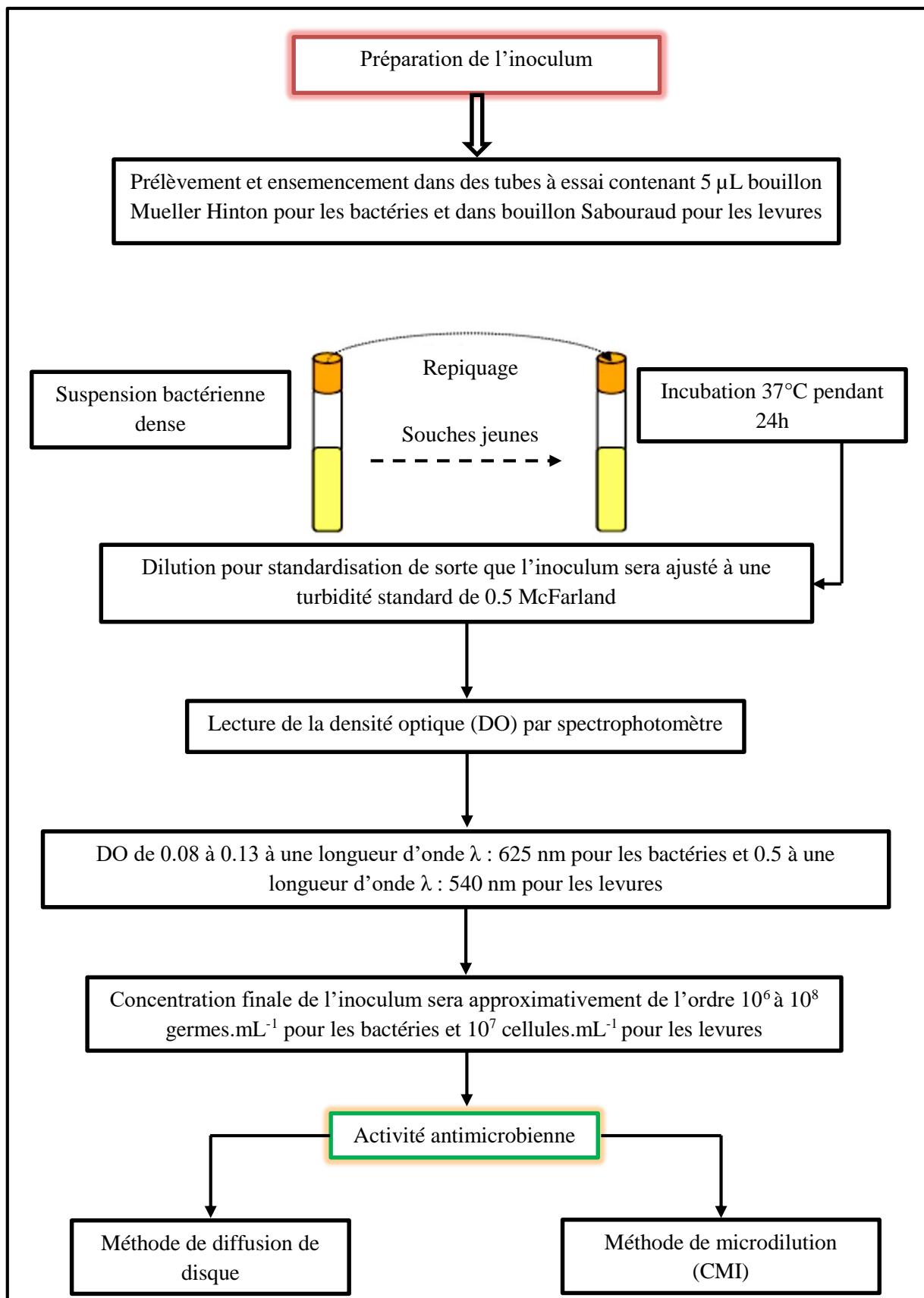


Figure 33. Méthode de présentation de l'inoculum microbien (CLSI, 2006 ; Noumi et al., 2011)

I.5.2. Méthodologie des tests antibactériens

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des feuilles de *Peganum harmala*, nous avons utilisé deux :

- a- La méthode de diffusion du disque l'aromagramme ; c'est une méthode qui permet de déterminer l'activité inhibitrice des huiles essentielles sur la croissance des germes par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'huiles essentielles ou de produit à base d'huiles essentielles. Puis de déterminer la concentration minimale d'inhibition (CMI) en milieu bouillon Mueller-Hinton pour les bactéries et le bouillon Sabouraud pour les levures, respectivement.
- b- La méthode de dilution en milieu liquide.

I.5.2.1. Méthode de Diffusion en milieu solide ou aromatobiogramme

Cette méthode est décrite par **Jacob et Tonei ,1979**, qui appelée technique aromatogramme, consiste à utiliser des disques de papier filtre stérile de 6mm imprégnés des concentrations différentes d'huiles essentielles pure et déposés à la surface d'un milieu gélose en boite pétrie préalablement ensemencé en surface à l'aide d'une suspension standardisée.

L'étude de la sensibilité des bactéries a été réalisée par la méthode de disque ou aromatogrammes. Cette technique est semblable à l'antibiogramme standard. Le principe de cette méthode repose sur le pouvoir de migration des huiles essentielles sur milieu solide. Des disques de papiers buvard ou papier Watman 3 imprégnés des antibiotiques ou des extraits (HE) à tester sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture pure (**Figure 30**). Après l'incubation (18h à 24h à 37°C), on observe autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (**Fauchère et Avril, 2002**).

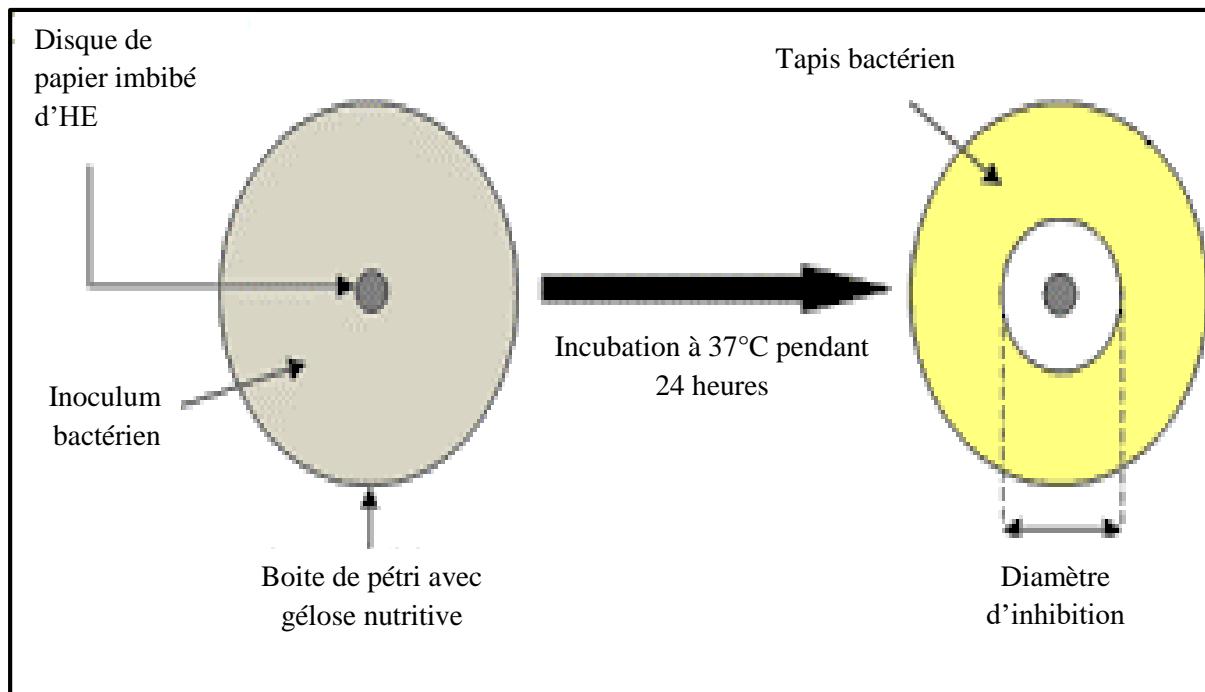


Figure 34. Principe de la méthode de la diffusion sur disque.

➤ Ensemencement

Vingt millilitres (20ml) de l'agar de Muller Hinton sont coulés dans des boites de pétri. Après solidification du milieu de culture, 100 μ l de la suspension microbienne à tester (10^8 UFC/ml) sont étalés en surface du milieu.

➤ Dépôt des disques

A l'aide d'une pince flambée au Bec Benzen, les disques d'antibiotiques ou des extraits sont déposés à la surface de la boite gélosée de Mueller-Hinton précédemment encensée. Les disques sont imprégnés de 10 μ l de la solution d'huile essentielle brute ou huile essentielle diluée (1/2, 1/4 et 1/8 v/v) dans 10 % de Diméthyle Sulfoxyde (DMSO). Les disques sont déposés à égale distance sur la surface de la gélose MH. Le DMSO à 10% est utilisé comme contrôle négatif, alors que les antibiotiques sont utilisés comme témoins positifs pour les bactéries et les levures. La boite gélosée ainsi préparée est maintenue à la température du laboratoire pendant 30 mn afin de permettre la pré-diffusion. Ensuite, elle sera incubée à 37°C pendant 24 heures. Les essais sont réalisés en trois répétitions.

Selon la classification de **Duraffourd *et al.*, 1990**, l'huile essentielle est considérée comme :

- Inactive si elle produit des diamètres d'inhibition inférieurs ou égaux à $D < 8$ mm.
- Intermédiaire pour des diamètres compris entre 8 et 14 mm.
- Elle est moyennement efficace pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm l'huile est très efficace.
- Nous avons considéré qu'une huile essentielle a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm (**Baudoux, 2001** ; **Sagdaç, 2003**).

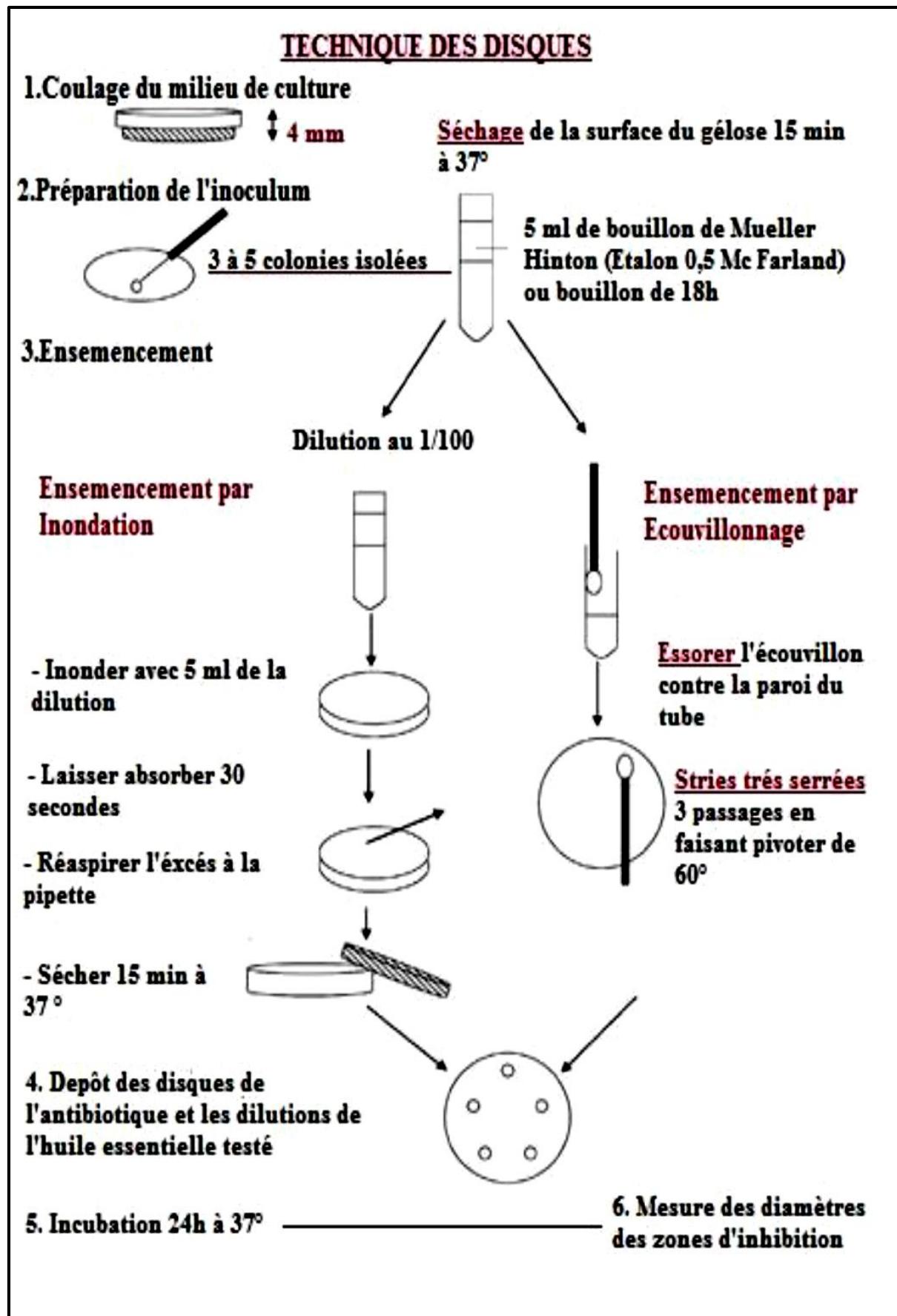


Figure 35. Technique de diffusion sur gélose par la technique des disques.

I.5.2.2. Méthode de microdilution en milieu liquide

La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h.

Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque puits (**Toty, A. et al., 2013**).

Cette méthode a pour objectif la détermination des CMI à partir d'une gamme de concentration de produit dans le milieu de culture. La micro dilution est réalisée dans des plaques Elisa de 96 puits.

➤ Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

Trois à Cinq colonies d'une culture bactérienne de 18 à 24 heures ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine puis délayées dans 10 ml de bouillon Muller Hinton et incubés pendant 3 à 5 heures à 37°C.

L'inoculum ainsi réalisé est dilué dans de l'eau physiologique en fonction du type de germes :

- Pour *Pseudomonas* et *staphylocoques*, 300 µl de l'inoculum est dilué dans 10 ml d'eau physiologique.
- Pour *Entérobactéries*, 100 µl de l'inoculum est dilué dans 10 ml d'eau physiologique.
- Pour les bactéries à Gram négatif, 200 µl de l'inoculum est dilué dans 10 ml d'eau physiologique.

Cette dilution nous a permis d'avoir une suspension bactérienne à 5.10^6 UFC/ml (condition standard). Pour faciliter la miscibilité des huiles essentielles dans le milieu liquide, nous avons utilisé le DMSO 5% à raison de 90% d'huile essentielle pour 10% DMSO (**Oussou et al., 2008**). Le DMSO a servi la dispersant des huiles dans l'eau. Il est à la fois miscible à l'huile et à l'eau. Les huiles essentielles dissoutes dans le DMSO (1/10) sont préparés par pesée et par ajout de volume nécessaire d'eau distillée pour obtenir une suspension mère à 3 mg/ml. La solution ainsi obtenue est agitée au vortex pendant 3min de sorte à avoir une bonne homogénéisation.

A partir de la solution mère des dilutions des huiles essentielles, séries des dilutions de sont préparées dans les puits de la plaque (3 mg.mL^{-1} dilué dans 5% DMSO).

Un réactif coloré est utilisé la résazurine. La couleur de la résazurine est violette. En présence de micro-organismes en croissance et d'acidification du milieu, cette couleur violette vire au rose, voire devient incolore.

Tous les puits des plaques de microtitration ont été remplis avec (100 μl) de bouillon nutritif MH. Une dilution en série de deux fois (dans toute la colonne) a été obtenue en transférant 100 μl de matériel d'essai de la première rangée au puits suivant dans la rangée suivante de la même colonne et de sorte que chaque puits contienne 100 μl d'huile essentielle à des concentrations décroissantes.

Une solution mère d'un volume de 100 μl de chaque huile essentielle de concentration appropriée est diluée de 2 en 2 dans 100 μl de (BN).

Ensuite l'ajoute de 100 μl d'inoculum bactérien à 10^6 UFC/ml (dilution au 1/100ème d'une culture de 18h).

Témoin négatif : 100 μl d'une solution mère (SM) des HEs et 100 μl de milieu (BN).

Témoin positif : 100 μl de milieu (BN) et 100 μl d'inoculum bactérien (IB).

La cinétique de croissance microbienne a été mesurée en lisant la densité optique à $\lambda : 620 \text{ nm}$ pour les bactéries et à $\lambda : 450 \text{ nm}$ pour les levures à 0-2-18-24-48-72 h par un lecteur d'absorbance de microplaques (Tecan Spectra II Microplate Reader). (**Yayi-Ladekan, E et al., 2011**).

- L'activité antimicrobienne est considérée comme forte lorsque les valeurs de CMI sont comprises entre 0,05 et 0,6 mg/ml.
- Modérée quand elles sont comprises entre 0,6 à 1,50 mg/ml.
- Faibles quand elles sont supérieures à 1,50 mg/ml.

Analyse statistique :

Toutes les expérimentations ont été réalisées en triplicata. Tous les résultats ont été exprimés en $XX \pm SEM$ et présenté par logiciel Excel.

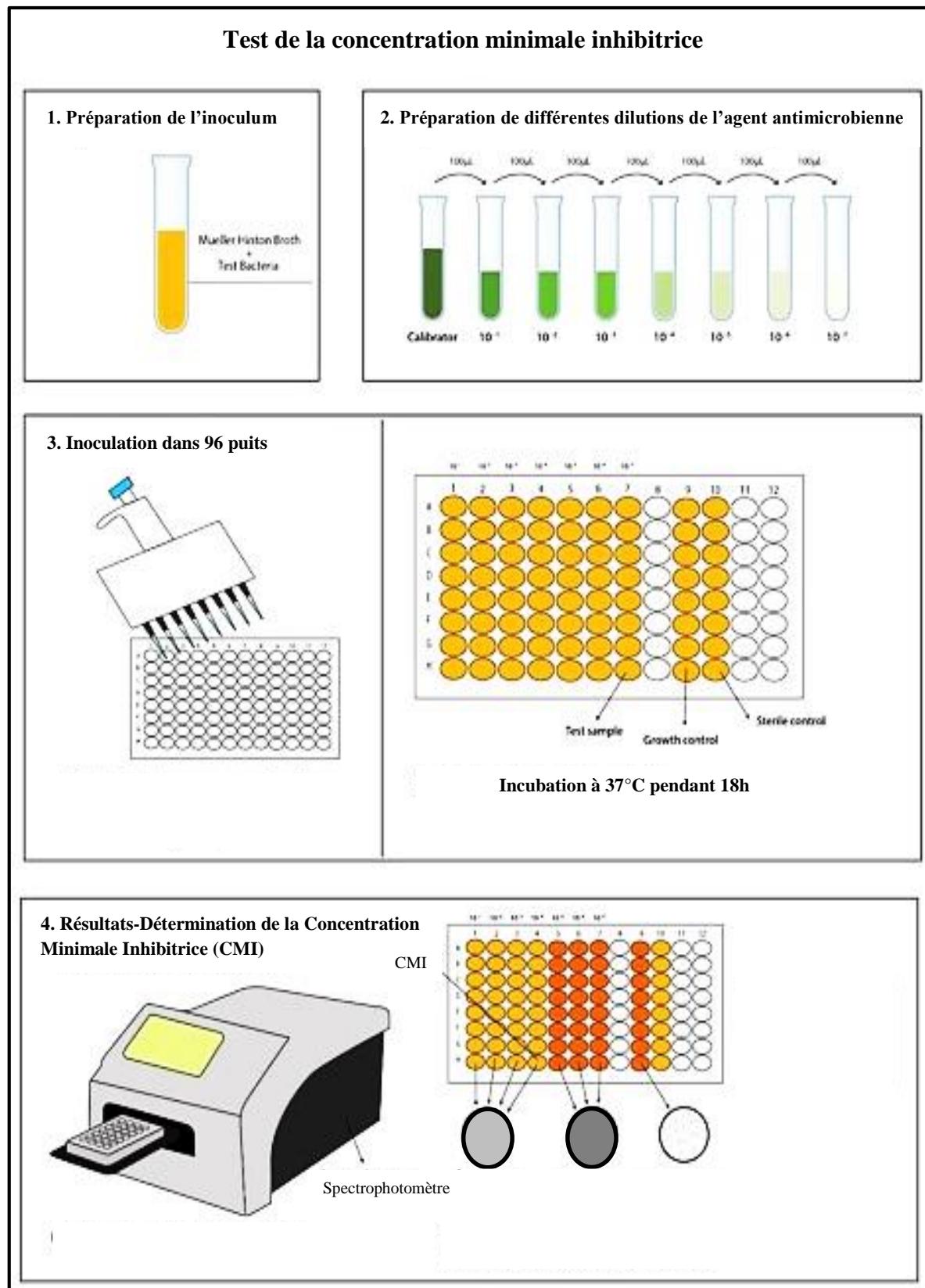


Figure 36. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

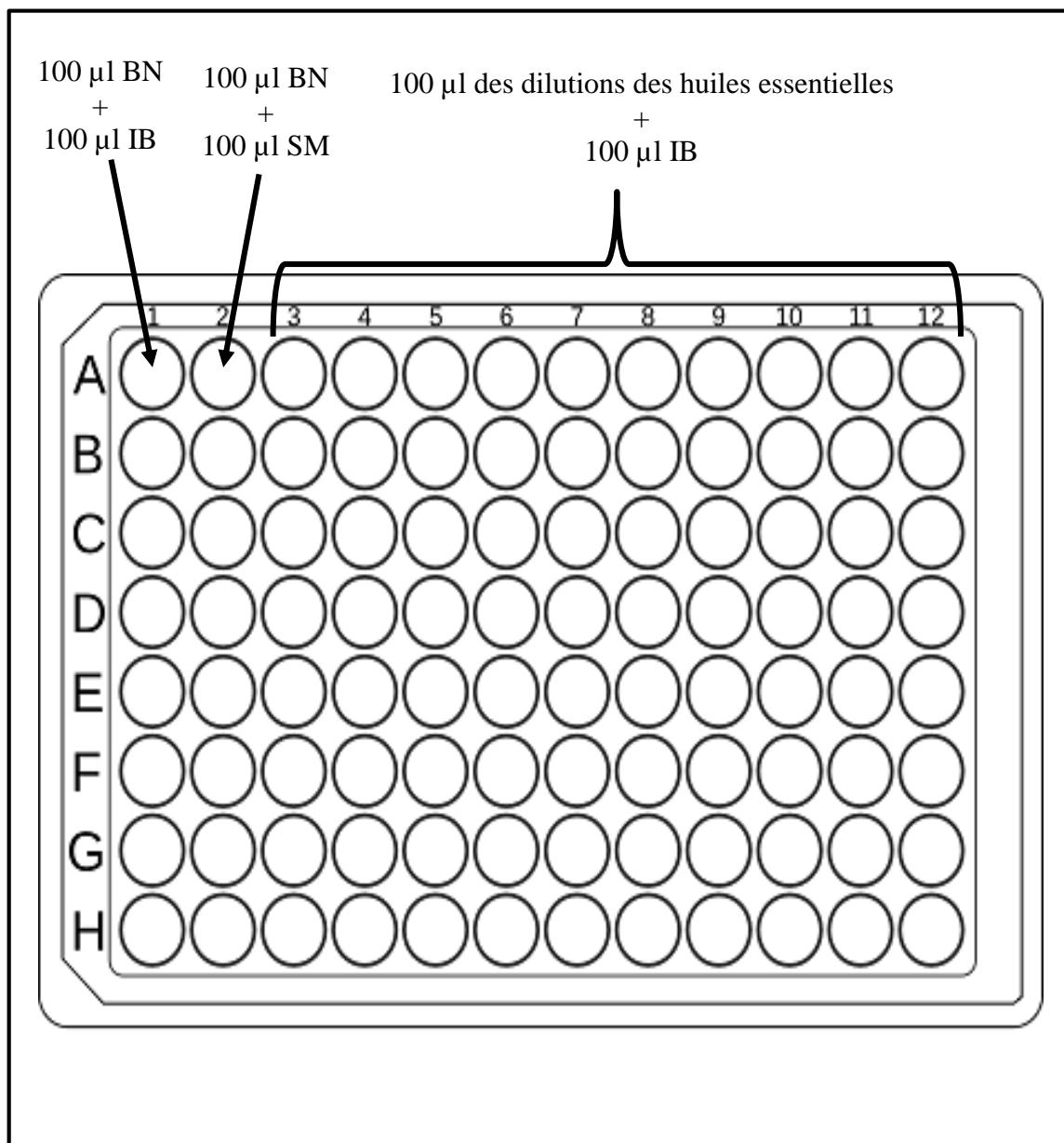


Figure 37. Illustration de la méthode du remplissage de la microplaqué pour déterminer la CMI.

I.5.3. Études de docking moléculaire des huiles essentielles de *Peganum harmala*

Le docking moléculaire est une méthode computationnelle répandue qui prédit l'affinité de liaison et le mécanisme d'interaction des petits composés avec les protéines cibles. Cela permet la simulation des interactions médicament-cible au niveau atomique, facilitant ainsi la compréhension des mécanismes de liaison clés et aidant à l'évaluation du potentiel pharmacologique des composés (**Morris, G. M et al., 2008 ; Meng, X. Y et al., 2011**).

Dans la présente enquête, un docking moléculaire a été réalisé sur les huit principaux composés bioactifs qui avaient été découverts dans *Peganum harmala* par le passé. L'objectif de cette étude était de valider et de renforcer les résultats expérimentaux concernant l'activité antibactérienne de ces composés. Les protéines utilisées dans cette simulation ont été obtenues à partir de la base de données RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) (**R.P.D. Bank, RCSB PDB. 2022**).

Pour garantir l'exactitude du processus de simulation, les huit molécules de ligand ont d'abord été optimisées à l'aide du logiciel Gaussian (**M.J. Frisch et al., 2009**), ce qui a permis de déterminer leurs géométries les plus stables avec une énergie minimale. Par la suite, les protéines cibles associées aux activités biologiques ont été préparées en utilisant Discovery Studio en retirant les molécules d'eau et les hétéroatomes, et en ajoutant des atomes d'hydrogène polaires ainsi que des charges de Kollman (**BIOVIA, 2022**). Les simulations de docking moléculaire ont ensuite été réalisées en utilisant AutoDock Vina (**O. Trott et al., 2010**), en s'assurant que chaque ligand était correctement positionné dans le site actif de sa protéine cible respective grâce au calcul des affinités de liaison. La constante d'inhibition (Ki) a été calculée en utilisant la relation $Ki = \exp(\Delta G/RT)$, où ΔG , R et T représentent respectivement l'énergie d'ancrage, la constante des gaz (1.9872036×10^{-3} kcal/mol) et la température ambiante (298,15 K) (**C. Yung-Chi et al., 1973**)

I.5.3.1. Simulations de docking moléculaire

Les résultats du docking moléculaire soulignent le rôle crucial des modifications structurelles dans l'amélioration de l'affinité des ligands envers leurs cibles biologiques.

Ces résultats offrent des perspectives prometteuses pour la conception rationnelle de nouveaux agents thérapeutiques sur mesure, tout en minimisant potentiellement la dépendance à des procédures expérimentales coûteuses et chronophages (**Kitchen, D. B et al., 2004; Pagadala, N. S et al., 2017**)

La sélection des protéines a été guidée par des critères spécifiques de qualité structurelle. Initialement, leurs conformations tridimensionnelles ont été élucidées par diffraction des rayons X (XRD), la technique expérimentale la plus précise pour l'identification de la structure des protéines. Les entrées correspondantes dans la Banque de Données des Protéines (PDB) présentent des résolutions inférieures à 2,50 Å (**R.P.D. Bank, RCSB PDB. 2022**), indiquant une haute précision structurelle (**Tableau 13**). De plus, les structures protéiques choisies incluent des valeurs R-free, un paramètre clé pour évaluer la fiabilité des modèles cristallographiques.

Toutes les protéines sélectionnées présentaient des valeurs R-free inférieures à 0.45, reflétant une forte concordance entre les données expérimentales et les modèles structurels (**voir Tableau 13**).

Le **tableau 13** présente les résultats obtenus pour le score de liaison (kcal/mol) et la constante d'inhibition (µM) de chaque composé avec diverses protéines pour des activités antibactériennes. Une valeur d'énergie de liaison négative indique une interaction probable entre le ligand et le récepteur.

De plus, les principales molécules présentes dans l'huile essentielle de *Peganum harmala* sont plus efficaces si leur constante d'inhibition est plus faible.

Chapitre II

Résultats et discussions

II.1. Aspects des huiles essentielles de *P.harmala* pour les deux régions

Tableau 11. Aspects des huiles essentielles de *P.harmala*.

Matière végétale	Aspect	Odeur	Couleur
<i>P.harmala</i> (region Bougntob)	Limpide	Forte disagreable	Jaunâtre
<i>P.harmala</i> (region Mechria)	Limpide	Forte disagreable	Jaunâtre

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur,) qui étaient utilisées autrefois pour évaluer la qualité d'une huile essentielle, ne donnent en réalité que des informations très limitées sur ces essences. En effet, d'autres techniques de caractérisation plus précises sont plus que nécessaires.

Des normes adoptées concernant les indices physicochimiques définissent la qualité d'une huile essentielle et par conséquent sa valeur commerciale.

II.2. Propriétés sensorielles et indices physicochimiques

L'huile essentielle des deux plantes est fractionnée de telle façon qu'on peut déterminer ses propriétés organoleptiques (apparence, couleur, odeur), des propriétés physicochimiques (pH, densité relative à 20 °C, pouvoir rotatoire à 20°C, indice de réfraction à 20 °C, indice d'acide et indice d'ester) qui leur sont propres.

C'est grâce à eux qu'il est possible de définir si une huile est de qualité adéquate.

Ces essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'association française de normalisation (A.F.N.O.R). Les résultats obtenus sont portés dans le tableau suivant :

Tableau 12. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du *P.harmala*.

Specification	<i>P.harmala (M)</i>	<i>P.harmala (B)</i>
pH	6.02	6.06
Indice d'acide	0.517	0.521
Densité relative	0.905	0.907
Indice de réfraction	+1.4693	+ 1.4695
Indice d'ester	22.7	23.2
Miscibilité à l'éthanol 90%	1 :3	1 :3
Point de congélation	-18	-18
Pouvoir rotatoire	+2°	+2°

II.2.1. Le pH

Le potentiel d'hydrogène, une variable facile à mesurer, est utilisée pour caractériser un produit fini ou encore à des fins de contrôle de qualité. La mesure du pH a donné une valeur de 6.02 et 6.06 respectivement pour l'HE de *P.harmala* de la région Mechria et la région Bougtob.

Les résultats montrent que cette huile a un pH relativement neutre ce qui nous permet de dire que le taux d'acidité est relative avec le potentiel d'hydrogène. En outre, plus le pH est élevé plus le taux d'acidité est faible.

II.2.2. La densité

La densité ou la masse volumique est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume. C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à la même température.

La norme AFNOR (2005) préconise une densité comprise entre 0,895 – 0,920 pour les huiles de très haute qualité. Avec une densité de 0.905 et 0.907 respectivement pour l'HE de la région Mechria et la région Bougtob, il y a lieu de suggérer que nos huiles

sont de bonne qualité.

Ce paramètre est lié à la composition chimique de cette huile qui est affectée par un grand nombre de facteurs tels que le phénotype, le moment de récolte, le type de terrain, la conservation, le procédé et les conditions d'extraction (**Tenschere et al., 2005**)

II.2.3. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est considéré comme un critère de pureté, également utilisé pour identifier des huiles. Chaque substance a son indice de réfraction. En effet, la norme **AFNOR (2005)** prévoit pour l'huile essentielle l'indice de réfraction compris entre 1,495 pour les huiles de haute qualité et 1,513 pour les huiles de moindre qualité). Dans notre cas, cet indice a touché une valeur de +1.4693 et +1.4695 respectivement pour l'huile obtenue de la plante de la région Mechria et la région Bougtob (**tableau 10**). Donc, il est apparu que nos huiles sont de bonne qualité.

Cet indice dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'insaturation et de la température, il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donne un indice plus élevé (**Trakia ,2020**).

II.2.4. Indice d'acide

En réalité, une huile essentielle fraîche contient très peu d'acides libres (**Fauconnier, 2006**). L'indice d'acide (IA) doit être le plus petit possible. Notre HE a donné un IA de 0.517 pour la region Mechria et 0.521 pour la region Bougtob. Ce résultat s'explique par le fait que nous avons pris soin de conserver nos HEs dans un contenant en verre opaque car il a été établi que la lumière favorise l'altération de la structure de l'huile et la prolifération des acides. De même, un indice d'acide inférieur à 2 est un indicateur d'une bonne conservation de l'huile.

II.2.5. Indice d'ester

L'indice d'ester représente un indicateur renvoyant directement à la qualité de l'huile essentielle étudiée. En effet, les huiles essentielles de très bonnes qualités renferment

une très grande quantité d'esters et proportionnellement, plus la qualité d'une huile est élevée, et plus elle contiendra d'esters (**Dummortier, 2006**). Nos HEs révèlent un indice d'ester (I_E) de 22,7 pour la région Mechria et 23,2 pour la région Bougtob.

II.2.6. La miscibilité à l'éthanol

La miscibilité à l'éthanol 90% est d'un volume d'huile essentielle pour trois volumes d'éthanol. Ces valeurs sont aux normes françaises (**Afnor,2000**).

II.2.7. Le point de congélation

Le point de congélation de notre huile est égale à -18°C pour l'huile essentielle.

Ce qui est à l'intervalle fixé des normes française NFT 75-222 qui est -15°C jusqu'à -19°C selon Afnor 2000.

Les résultats indiquent que les paramètres physico-chimiques des échantillons analysés se retrouvent dans les fourchettes de références établies par les normes.

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice d'acide, indice de réfraction...) est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques : GC/SM, ces dernières, sont souvent utilisées comme moyen analytique complémentaire pour l'analyse structurale des substances volatiles, elles ont été employées pour identifier qualitativement les huiles essentielles des feuilles de la *Peganum harmala*.

II.3. Rendement d'extraction

Le rendement en huile essentielle obtenue par hydro-distillation de plantes sèches était de $0,217 \pm 0,03\%$ pour l'échantillon de *P. harmala* de la région de Bougtob et de $0,211 \pm 0,05\%$ pour l'échantillon de la région de Mechria. Dans une étude d'**Ida et al.** dans la région de Bousaada (sud de l'Algérie), l'hydrodistillation a donné $0,005\%$ (**Ida et al., 2016**).

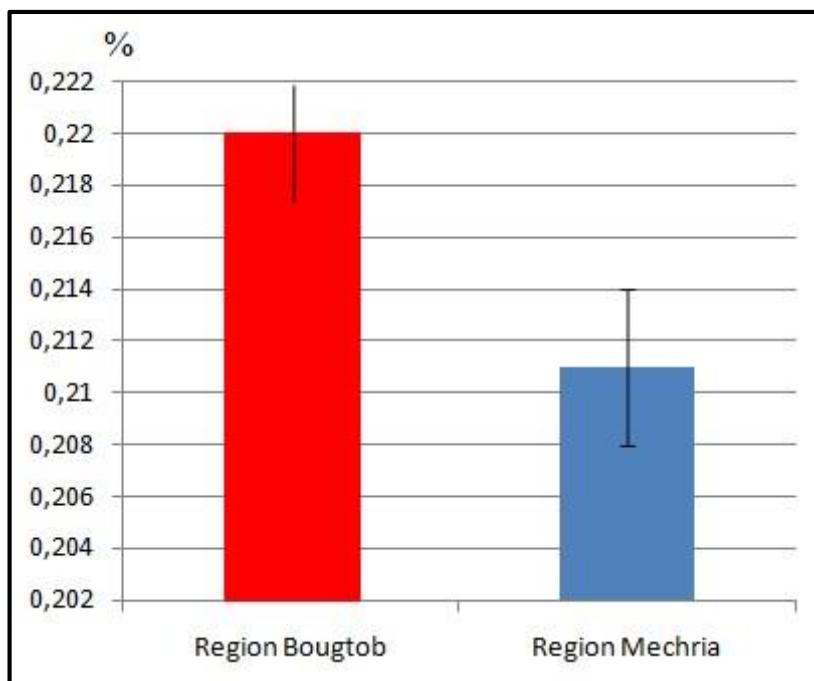


Figure 38. Le rendement en huile essentielle de *P.harmala* a été obtenu par hydro-distillation pour différentes régions.

Généralement la teneur des plantes en huiles essentielles est faible et parfois très faible de l'ordre de 1% à 1%. A l'exception du *Badiane de Chine* avec une teneur en essence est supérieure à 5%; et *Clou de girofle* qui renferme plus de 15% d'essence (**Benouali, 2016**).

Ce rendement le plus important pourrait être expliquée par le bon choix de la période de récolte (avril stade végétatif de *Peganum harmala*), selon **Laëtitia, (2015)** dans cette période les plantes produites une teneur maximale en essence donc pour un rendement optimal, la récolte de l'essence doit être s'effectuer pendant le stade végétatif propre à chaque plante aromatique.

De plus la composition en HEs, extraite par hydrodistillation, peut être influencée par la quantité en eau, mise dans le ballon de distillation, car certains composés tels que : le terpinèn-4-ol, l' α -terpinéol et le cinéol sont peu solubles dans l'eau (**Williams et Lusunzi, 1994**).

Les variations constatées dans le rendement en huile essentielle de nos échantillons par rapport à certaines études antérieures peuvent être dues à certains facteurs environnementaux (tels que la composition du sol, la situation géographique et les conditions climatiques), la partie de la plante utilisée, l'âge de la plante, et la période de la saison de croissance ou même à des facteurs génétiques (**Hussain et al., 2009** ; **Anwar et al., 2009**).

En effet, le rendement d'extraction, tout comme la qualité d'une HE sont influencés par la nature du sol sur lequel la plantation est effectuée, le matériau des appareils utilisés, la propreté du matériel, la pression de fonctionnement, la régularité de la chauffe, le refroidissement du distillat et la régularité de sa coulée, la méthode et la durée de distillation, etc (**Bruneton, 1993** ; **Brûlé et Pecout, 1995** ; **Bennadja et al., 2013**).

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice d'acide, indice de réfraction...) est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques : GC/SM, ces dernières, sont souvent utilisées comme moyen analytique complémentaire pour l'analyse structurale des substances volatiles, elles ont été employées pour identifier qualitativement les huiles essentielles des feuilles de la *Peganum harmala*.

II.4. Composition chimique des huiles essentielles

La caractérisation des huiles essentielles a été réalisée par GC-SM.

Les pics du chromatogramme de l'huile essentielle de feuilles de *Peganum harmala* sont comparés à ceux des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre avec une banque de données informatisées, l'appareil GC-SM nous a donné les

différents chromatogrammes de masse et les indices de rétention des substances comparables qui peuvent constituer cet extrait.

Les chromatogrammes de l'huile essentielle ont de nombreux pics et beaucoup d'entre eux se chevauchent. Le profil chromatographique de l'huile essentielle des feuilles de *Peganum harmalade* deux régions du sud Algérien est dans la **figure 39-40**.

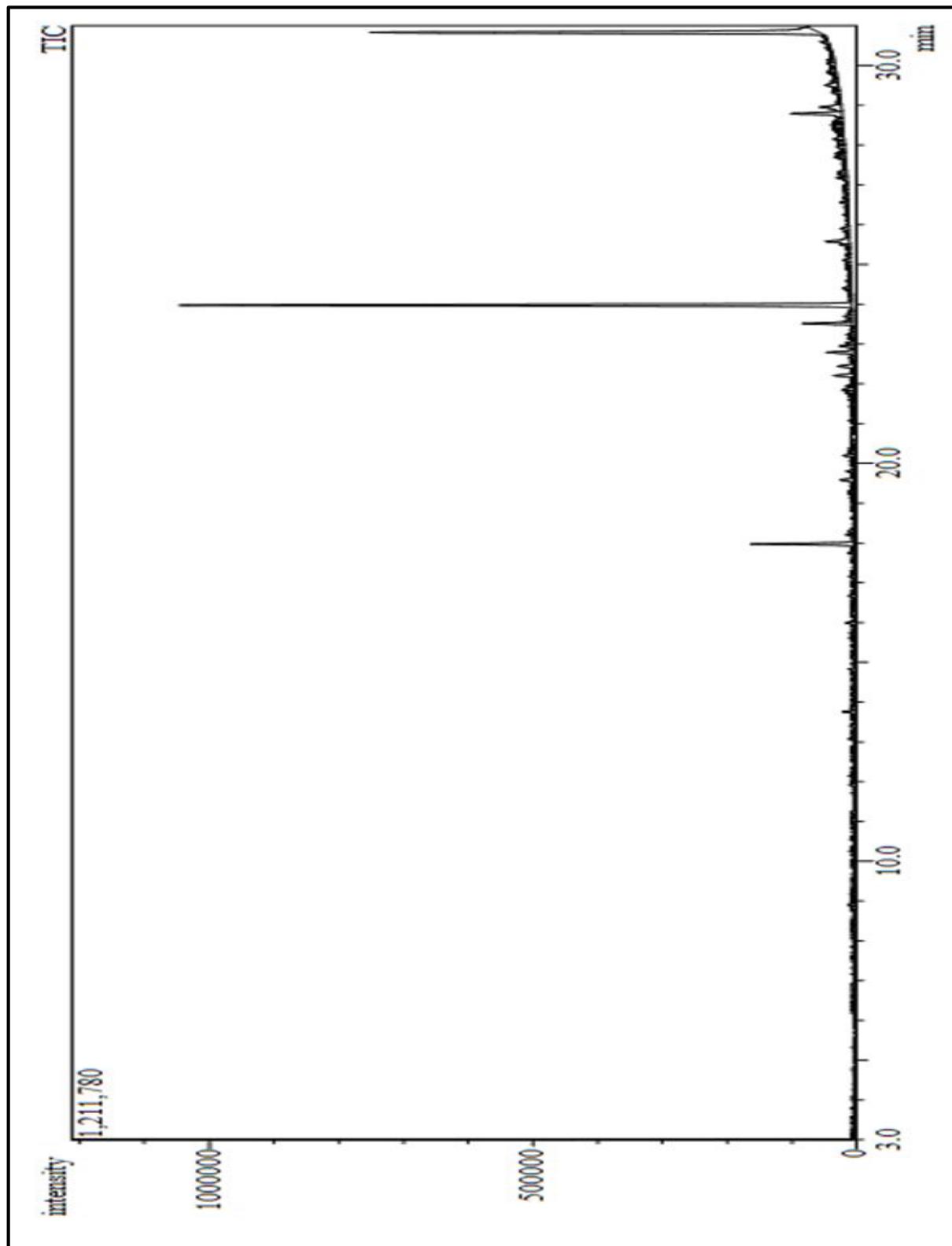


Figure 39. Profils chromatographiques en phase gazeuse des principaux constituants des huiles essentielles de *Peganum harmala* pour la région de Bougntob.

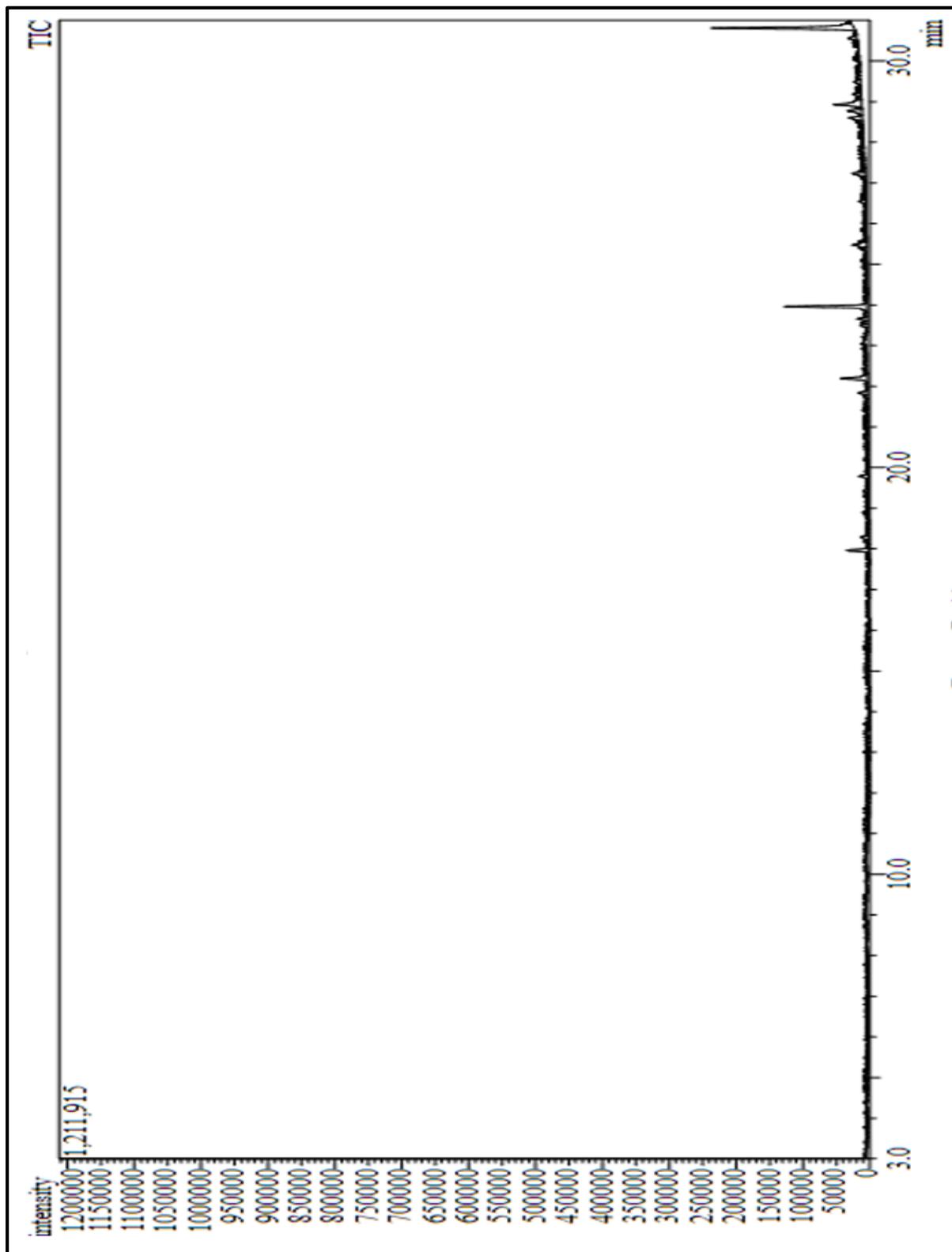


Figure 40. Profils chromatographiques en phase gazeuse des principaux constituants des huiles essentielles de *Peganum harmala* pour la région de Mechria.

Tableau 13. Composants phytochimiques identifiés dans l'huile essentielle de *P. harmala* (région de Bougtnob) par GC-MS.

Pics	Constituants	Formule moléculaire	RT (min)	Area (%)
01	Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	13.393	0.30
02	D - carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	13.758	0.53
03	Anisole	C ₁₀ H ₁₂ O	15.986	0.36
04	5,9-undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (e)-	C ₁₃ H ₂₂ O	16.655	0.31
05	Heptadecane, 8-methyl-	C ₁₈ H ₃₈	17.742	0.22
06	Carbamic acid	C₁₇H₂₇NO₂	17.973	3.52
07	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O	18.295	0.24
08	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	18.816	0.13
09	Ketone	C ₈ H ₁₂ O	19.287	0.18
10	Ethanone, 1-(1,3a,4,5,6,7-hexahydro-4-hydroxy-3,8-dimethyl-5-azulenyl)-	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	19.584	0.56
11	Hexatriacontane	C ₃₆ H ₇₄	19.807	0.25
12	6,8-nonadien-2-one, 6-methyl-5-(1-methylethylidene)-	C ₁₃ H ₂₀ O	20.196	0.33
13	2-Benzyl-3-oxopropanoic acid, ethyl ester	C ₁₃ H ₁₆ O ₃	20.305	0.20
14	P-Cymen-7-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	21.670	0.23
15	Tetrapentacontane	C ₅₄ H ₁₁₀	21.768	0.31
16	2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	21.847	0.43
17	Phytone	C ₁₈ H ₃₆ O	22.205	0.82
18	Δ-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	22.438	0.67
19	2-aminobenzaldehyde	C₇H₇NO	22.786	1.03
20	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	22.944	0.46
21	Thymol	C₁₀H₁₄O	23.514	1.77
22	Hexacontane	C ₆₀ H ₁₂₂	23.695	0.32

23	D-(+)-carvone	C₁₀H₁₄O	23.978	21.15
24	Ar-tumerone	C ₁₅ H ₂₀ O	24.401	0.27
25	Octaborane	B ₈ H ₁₂	24.955	0.14
26	2-Nonen-1-ol, 2-methyl-	C ₁₀ H ₂₀ O	25.000	0.18
27	Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	25.110	0.32
28	Pentadecane, 8-hexyl-	C ₂₁ H ₄₄	25.495	0.31
29	Dihydroactinidiolide	C₁₁H₁₆O₂	25.578	1.21
30	Quinoline, 6-butyl-	C ₁₃ H ₁₅ N	25.818	0.19
31	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	C ₁₇ H ₃₀ OSi	25.901	0.36
32	Dihydroartemisinin, 6-deshydro-5-deshydroxy-3-desoxy-	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	26.246	0.18
33	Diethyl phthalate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	26.552	0.26
34	Solasonine	C ₄₅ H ₇₃ N ₁ O ₁₆	26.671	0.19
35	2-propenoic acid, 3-(dimethylamino)-3-ethoxy-, ethyl ester	C ₇ H ₁₄ O ₃	26.954	0.19
36	P-vinylphenol	C ₈ H ₈ O	27.174	0.39
37	Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	27.260	0.34
38	4-quinolinecarboxaldehyde	C ₁₀ H ₇ NO	27.315	0.35
39	Formamide, N-phenyl-	C ₇ H ₇ NO	27.695	0.40
40	Indole	C ₈ H ₇ N	27.782	0.32
41	5.alpha.-cholestan-6.beta.-amine, n,n-dimethyl-	C ₂₉ H ₅₃ N	27.962	0.31
42	Methanone, diphenyl-	C ₁₃ H ₁₂ N	28.154	0.48
43	N-Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	28.385	0.24
44	Ethyl ether	C ₄ H ₁₀ O	28.501	0.48
45	Phosphorochloridothioic acid, O,O-dimethyl ester	C ₂ H ₆ ClO ₂ PS	28.570	0.19
46	3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldehyde	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	28.615	0.29
47	Lauric acid	C₁₂H₂₄O₂	28.791	2.10
48	Tetrapentacacontane	C₅₄H₁₁₀	28.950	1.32

49	3-methylheptadecane	C ₁₈ H ₃₈	29.328	0.30
50	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 8-methylnonyl ester	C ₂₂ H ₃₄ O ₄	29.500	0.75
51	21.xi-methyl-17-isocholest-16-en-3.Beta.-ol	C ₂₇ H ₄₆ O	29.848	0.35
52	Triethylene glycol monododecyl ether	C ₁₈ H ₃₈ O ₄	30.058	0.44
53	Cyclohexanopropanol, .alpha.,2,2,6-tetramethyl-	C ₁₃ H ₂₆ O	30.144	0.25
54	Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	30.595	0.33
55	Phytol	C₂₀H₄₀O	30.833	17.41
Total				100

Tableau 14. Composants phytochimiques identifiés dans l'huile essentielle de *P. harmala* (région de Mechria) par GC-MS.

Pics	Constituants	Formule moléculaire	RT (min)	Area (%)
01	Thiirane, octyl-	C ₁₀ H ₂₀ OS	14.355	0.38
02	Phosphoric acid	C ₁₅ H ₄₁ O ₆ PSi ₄	14.962	0.36
03	Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	15.602	0.33
04	Methyl 2,6-anhydro-.alpha.-d-altroside	C ₇ H ₁₂ O ₅	15.853	0.52
05	Butanedioic acid, decyl phenylmethyl ester	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	17.162	0.38
06	2-Methyl-decahydro-4-quinolone	C ₁₀ H ₉ NO	17.268	0.29
07	Butylated Hydroxytoluene	C₁₅H₂₄O	17.960	1.48
08	β-Ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	18.182	0.38
09	2-Butenoic acid	C ₁₈ H ₂₇ NO ₅	18.288	0.69
10	2-Nonadecene	C ₁₉ H ₃₈	19.147	0.38
11	Cyclobutaneacetamide, N-(4-methoxyphenyl)	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	19.288	0.34
12	Citronellyl valerate	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	19.427	0.43
13	Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	19.780	0.63
14	o-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	20.255	0.24
15	Hexane, 2,3,4-trimethyl	C ₉ H ₂₀	20.529	0.23
16	Phenanthrene, 3-methyl-	C ₁₅ H ₁₂	20.785	0.57
17	Propanoic acid, ethyl ester	C ₅ H ₁₀ O ₂	21.060	0.21
18	Pentanoic acid, 5-hydroxy-2-propyl	C ₁₄ H ₃₂ O ₃ Si ₂	21.206	0.23
19	Perhydro-htx-2-one, 2-depentyl-, acetate ester	C ₁₆ H ₂₇ NO ₃	21.411	0.23
20	13-Methyltritriacontane	C ₃₄ H ₇₀	21.735	0.25
21	2,6-Di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	21.833	0.62
22	Phytone	C₁₈H₃₆O	22.189	2.18
23	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	23.499	0.46

24	Phytol acetate	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	23.567	0.37
25	Tetrapentacontane	C ₅₄ H ₁₁₀	23.657	0.71
26	Carvone	C₁₀H₁₆O	23.960	5.92
27	Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	25.090	0.33
28	Hexatriacontane	C₃₆H₇₄	25.472	1.27
29	2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	25.562	0.37
30	Quinoline, 6-butyl-	C ₁₃ H ₁₅ N	25.828	0.32
31	α-Pyrrolidone, 5-[2-butyrylethyl]-	C ₁₀ H ₁₇ NO ₂	26.016	0.42
32	Malonic acid, 6-heptynyl	C ₁₅ H ₂₈ O ₄	26.285	0.39
33	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	26.541	0.63
34	Dotriacontane	C₃₂H₆₆	27.233	1.13
35	Spiro[cyclopropane-1,2'(1'h)-phenanthrene]-1',4'(3'h)-dione,8'-(formyloxy)methyl]-4'b,5',6',7',8',8'a,9',	C ₂₁ H ₂₈ O ₇	27.281	0.34
36	1,3,2-Dioxaphosphorinane,2-(benzyloxy)-2-oxo-	C ₁₀ H ₁₃ O ₄ P	27.811	0.57
37	2-(2-Bromo-ethyl)-3-methyl-oxirane	C ₅ H ₉ BrO	28.377	0.23
38	3-Quinuclidinol	C ₇ H ₁₃ NO	28.508	0.47
39	3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldehyde	C₁₅H₂₂O₂	28.600	1.14
40	Lauric acid	C₁₂H₂₄O₂	28.773	1.39
41	Benzenamine, 2,4-dinitro-N-phenyl-	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₄	28.840	0.36
42	Tetrapentacontane	C₅₄H₁₁₀	28.924	2.80
43	Phosphonic acid, bis(1-methylethyl) ester	C ₆ H ₁₅ O ₃ P	29.059	0.40
44	Pentadecane, 2,6,10-trimethyl-	C ₁₈ H ₃₈	29.181	0.55
45	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 8-methylnonyl ester	C ₂₂ H ₃₄ O ₄	29.477	0.68
46	Tetrapentacontane	C ₅₄ H ₁₁₀	30.554	0.76
47	Phytol	C₂₀H₄₀O	30.808	10.24
Total				100

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle de *P.harmala* de la région du Bougntob a révélé la présence de 55 volatiles, constituant 66,59% de l'huile essentielle totale récupérée sur matière sèche (**Tableau 13**). L'analyse chimique a montré que l'huile essentielle caractérisée possédait de nombreuses substances potentiellement bioactives, qui ont été identifiées, et les composés suivants représentent les principaux constituants : (1) Carvone 21,15%, (2) Phytol 17,41%, (3) Acide carbamique 3,52%, (4) Acide laurique 2,10%, (5) Thymol 1,77%, (6) Tétrapentacontane 1,32%, (7) Dihydroactinidiolide 1,21%, (8) 2-Aminobenzaldéhyde 1,03%.

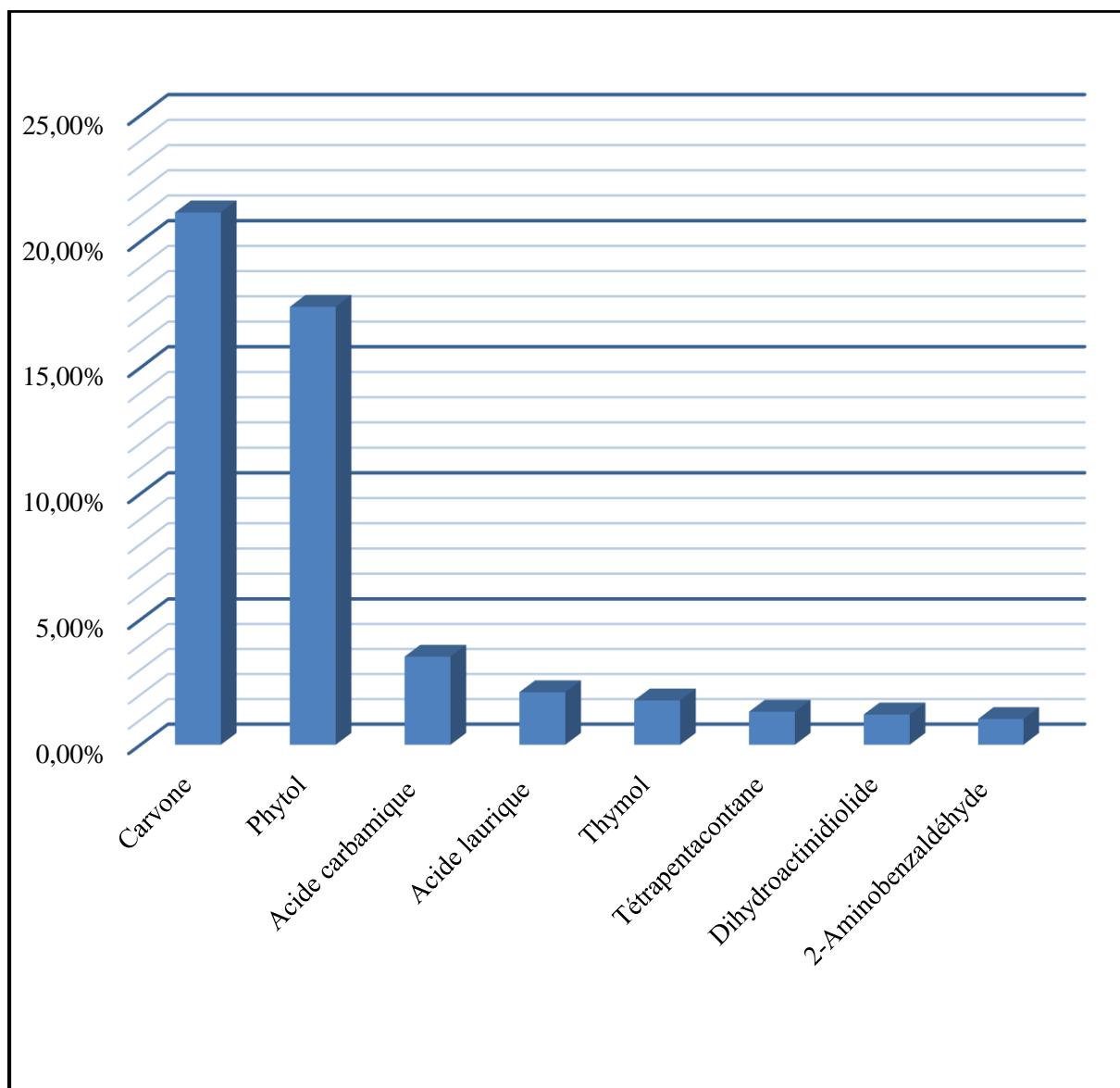


Figure 41. Les constituants majeurs de huile essentielles de *P.harmala* de la région du Bougntob par GC-MS.

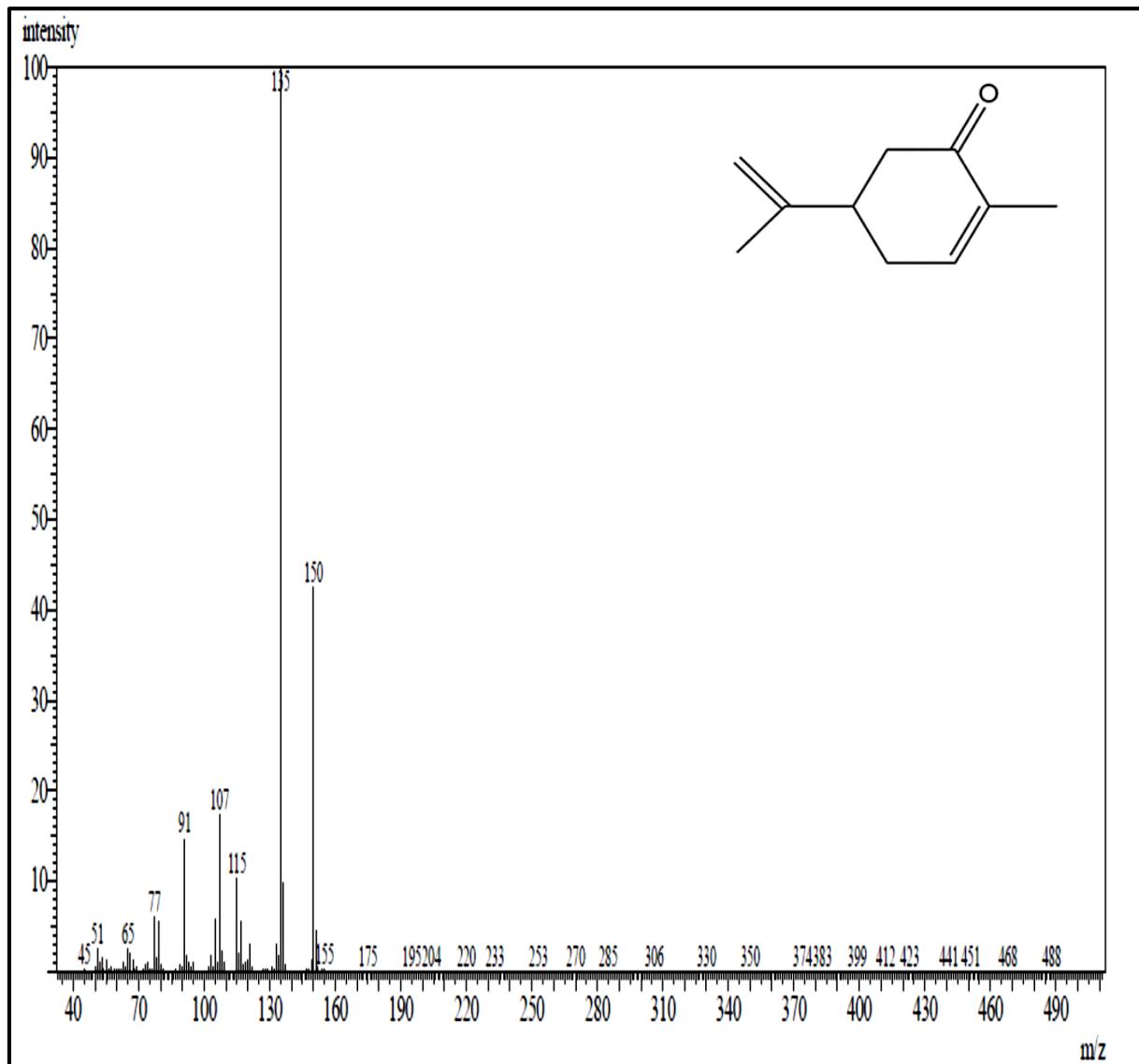


Figure 42. Spectre de masse du composant Carvone de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

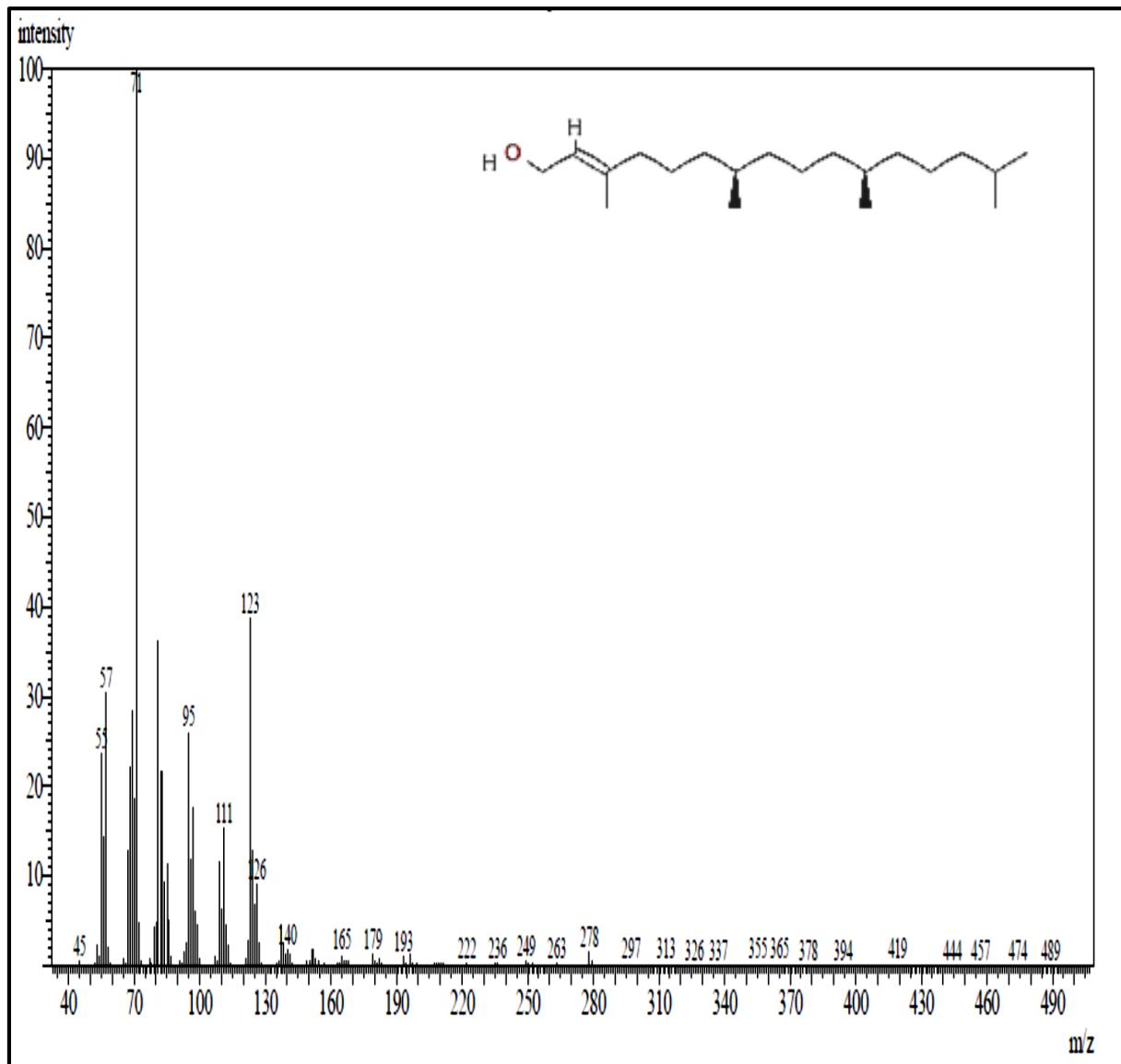


Figure 43. Spectre de masse du composant Phytol de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

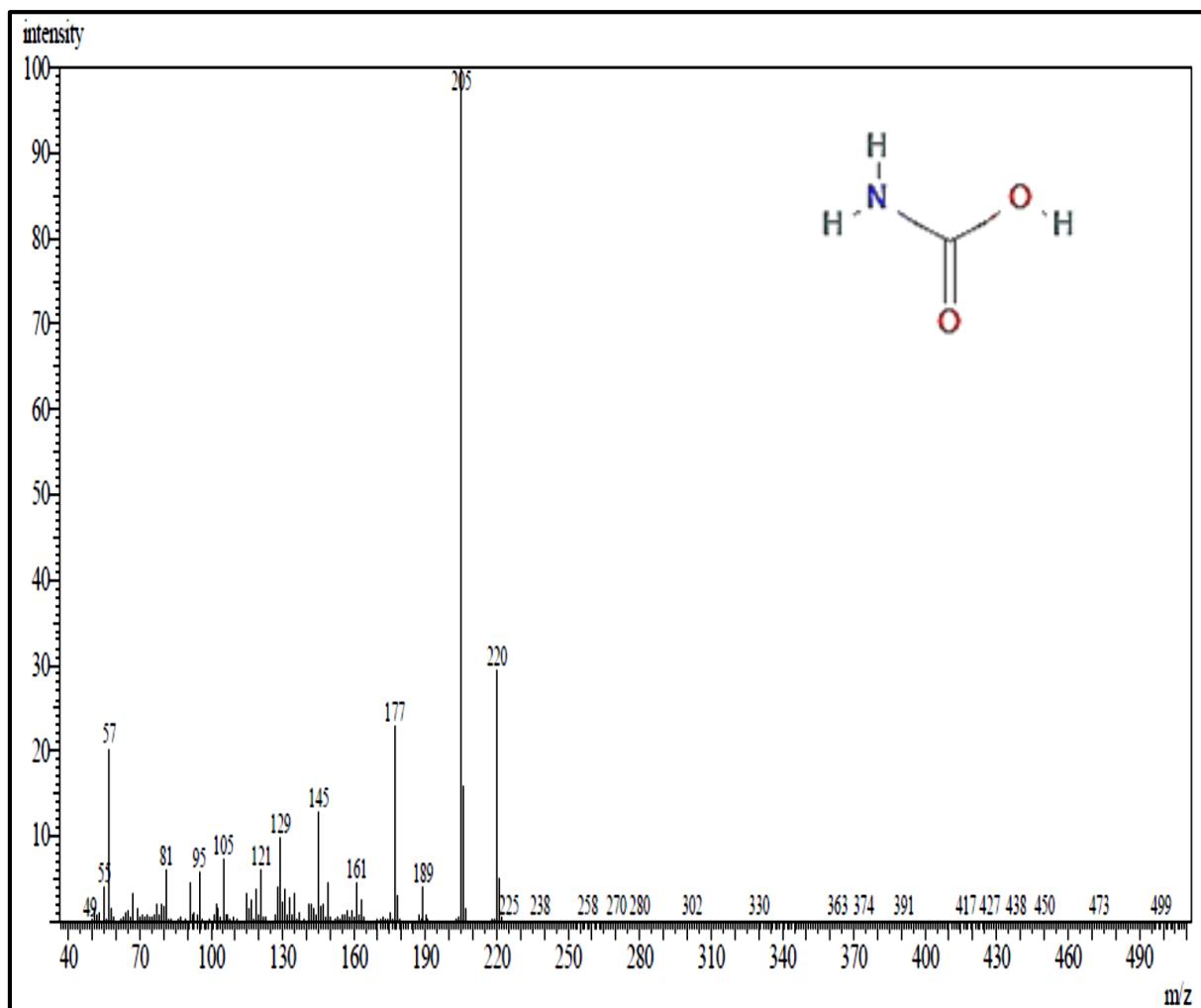


Figure 44. Spectre de masse du composant Acide carbamique de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

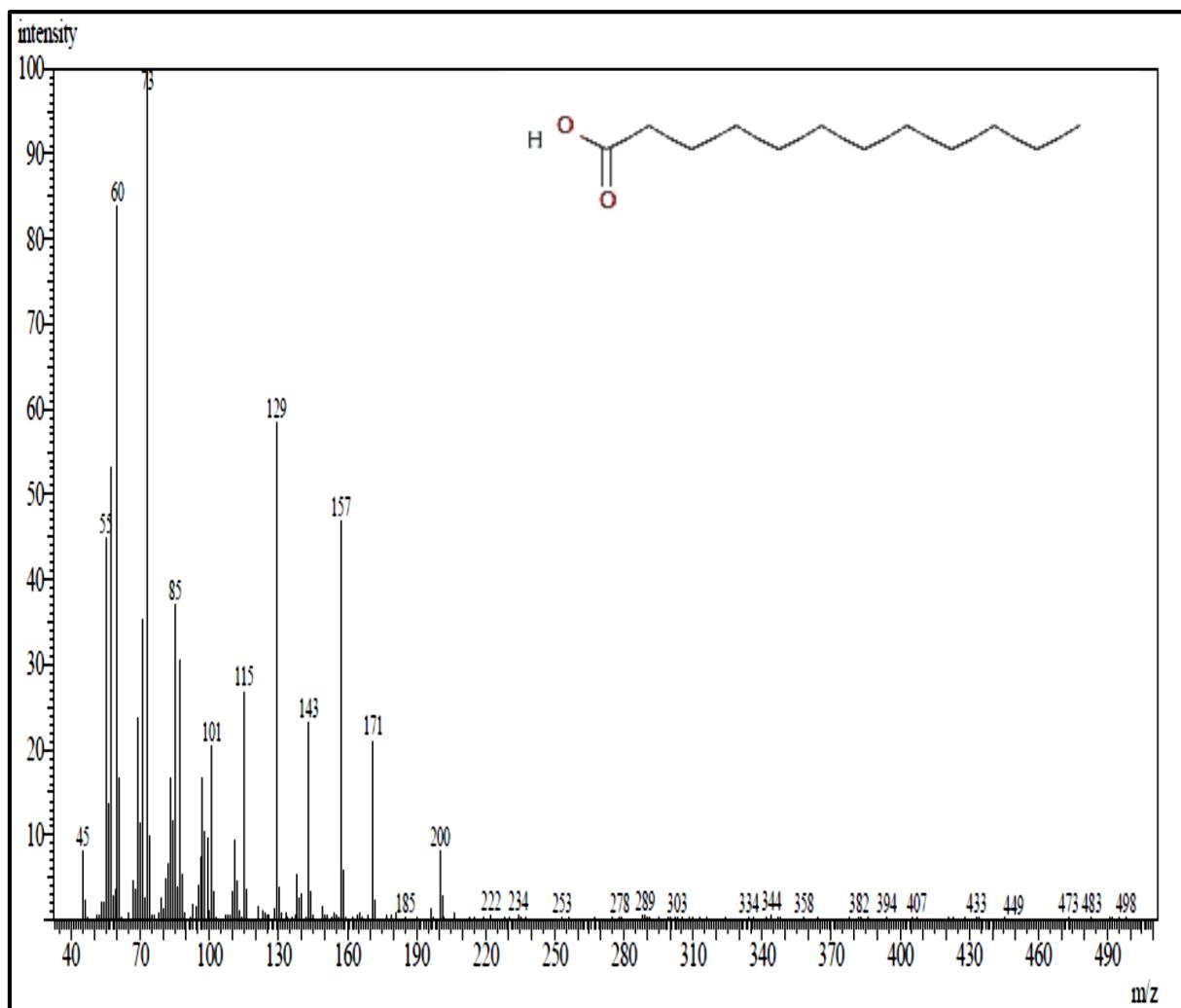


Figure 45. Spectre de masse du composant Acide laurique de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

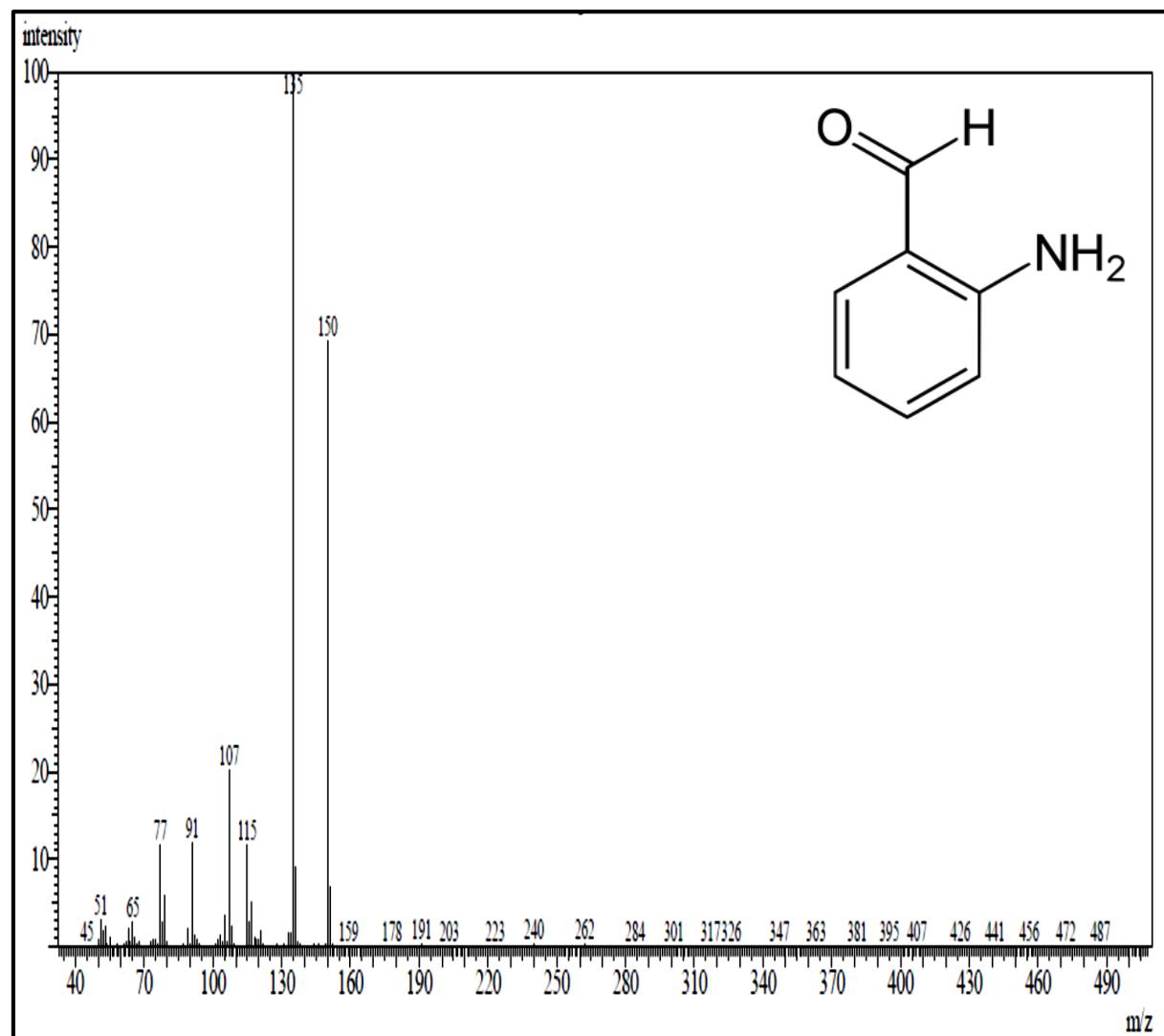


Figure 46. Spectre de masse du composant Thymol de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

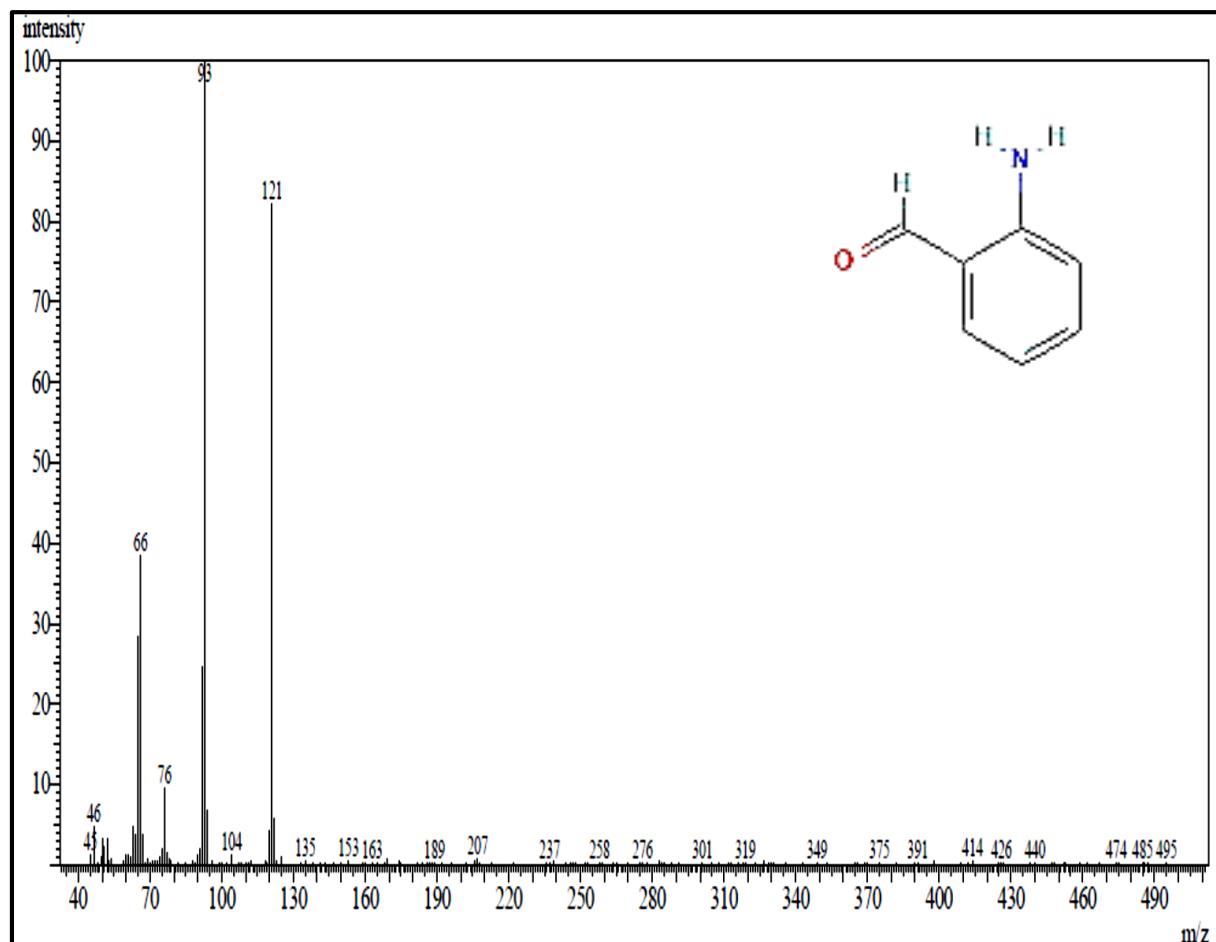


Figure 47. Spectre de masse du composant 2-Aminobenzaldehyde de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

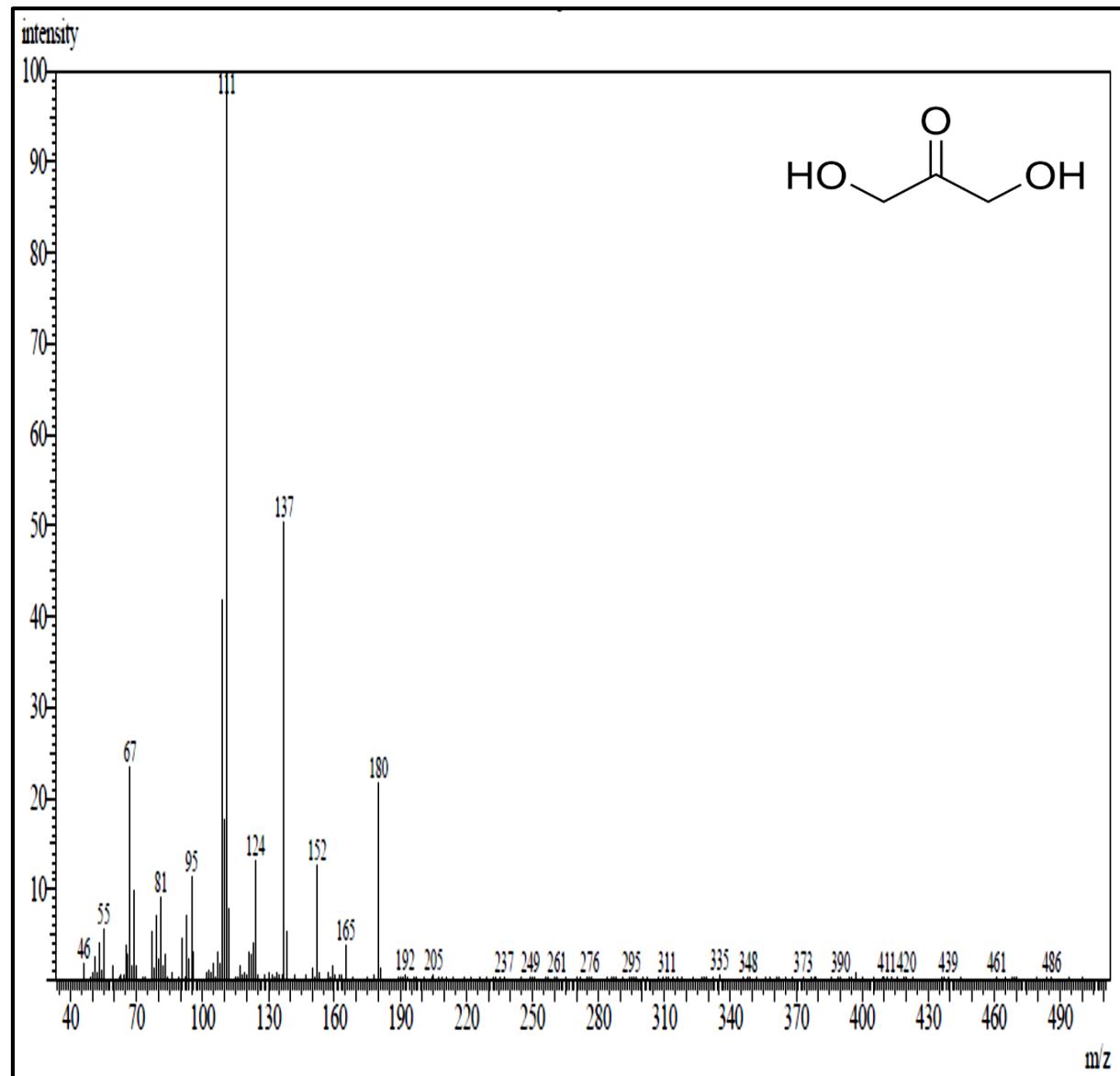


Figure 48. Spectre de masse du composant Dihydroactinidiolide de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

En revanche, l'analyse chromatographique de l'huile essentielle *de P.harmala* de la région de Mechria a démontré la présence de 47 volatiles, constituant 43,6% de l'huile essentielle totale récupérée sur matière sèche (**Tableau 14**). L'analyse chimique de l'huile essentielle de la région de Mechria a montré que ses principaux produits sont : **(1)** Phytol 10,24%, **(2)** Carvone 5,92%, **(3)** Tétrapentacontane 2,80%, **(4)** Phytone 2,18%, **(5)** Hydroxytoluène butylé 1,48%, **(6)** Acide laurique 1,39%, **(7)** Hexatriacontane 1,27%, **(8)** 3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldéhyde 1,14%.

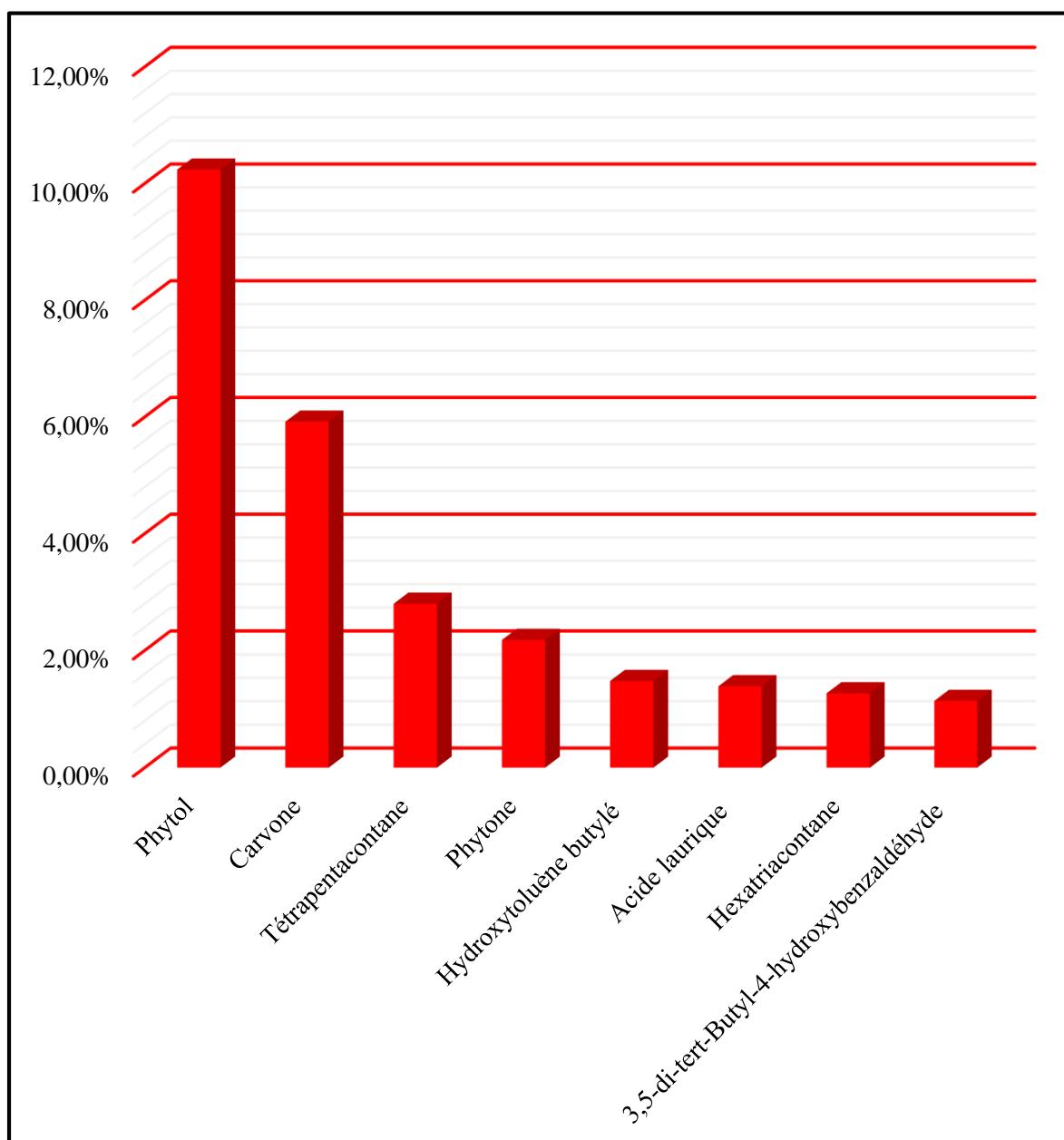


Figure 49. Les constituants majeurs de huile essentielles de *P.harmala* de la région du Mechria par GC-MS.

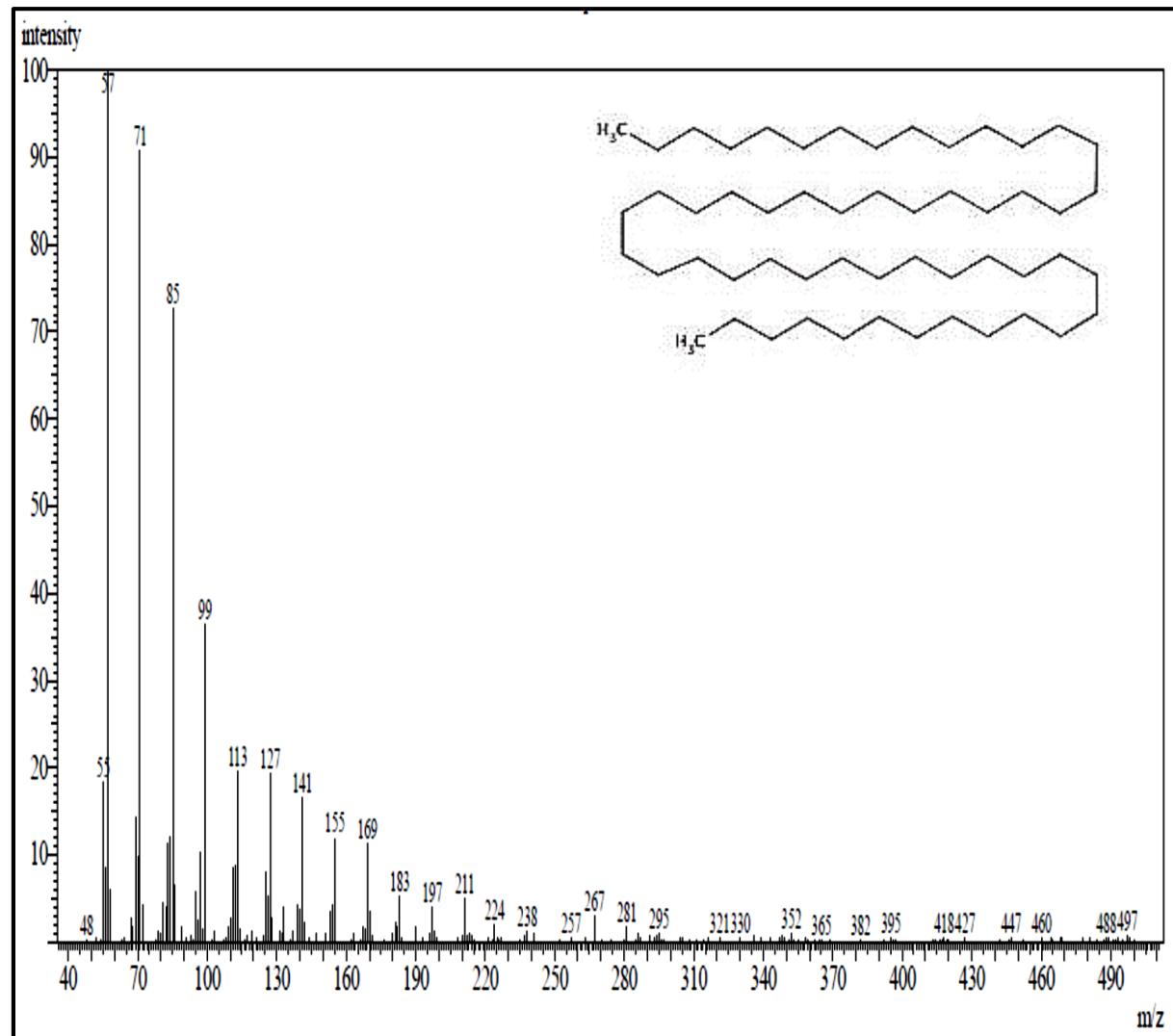


Figure 50. Spectre de masse du composant Tétrapentacontane de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

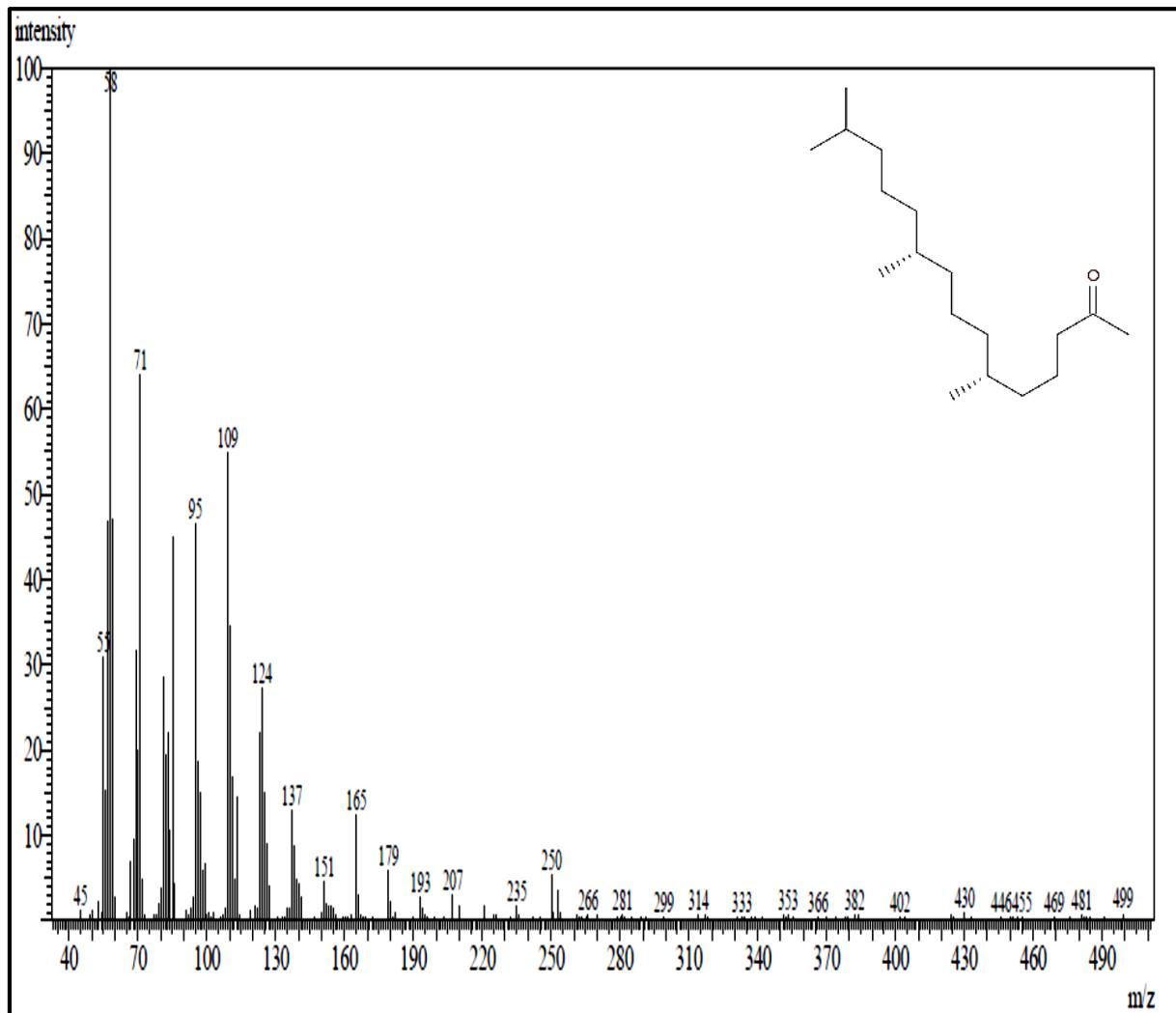


Figure 51. Spectre de masse du composant Phytone de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

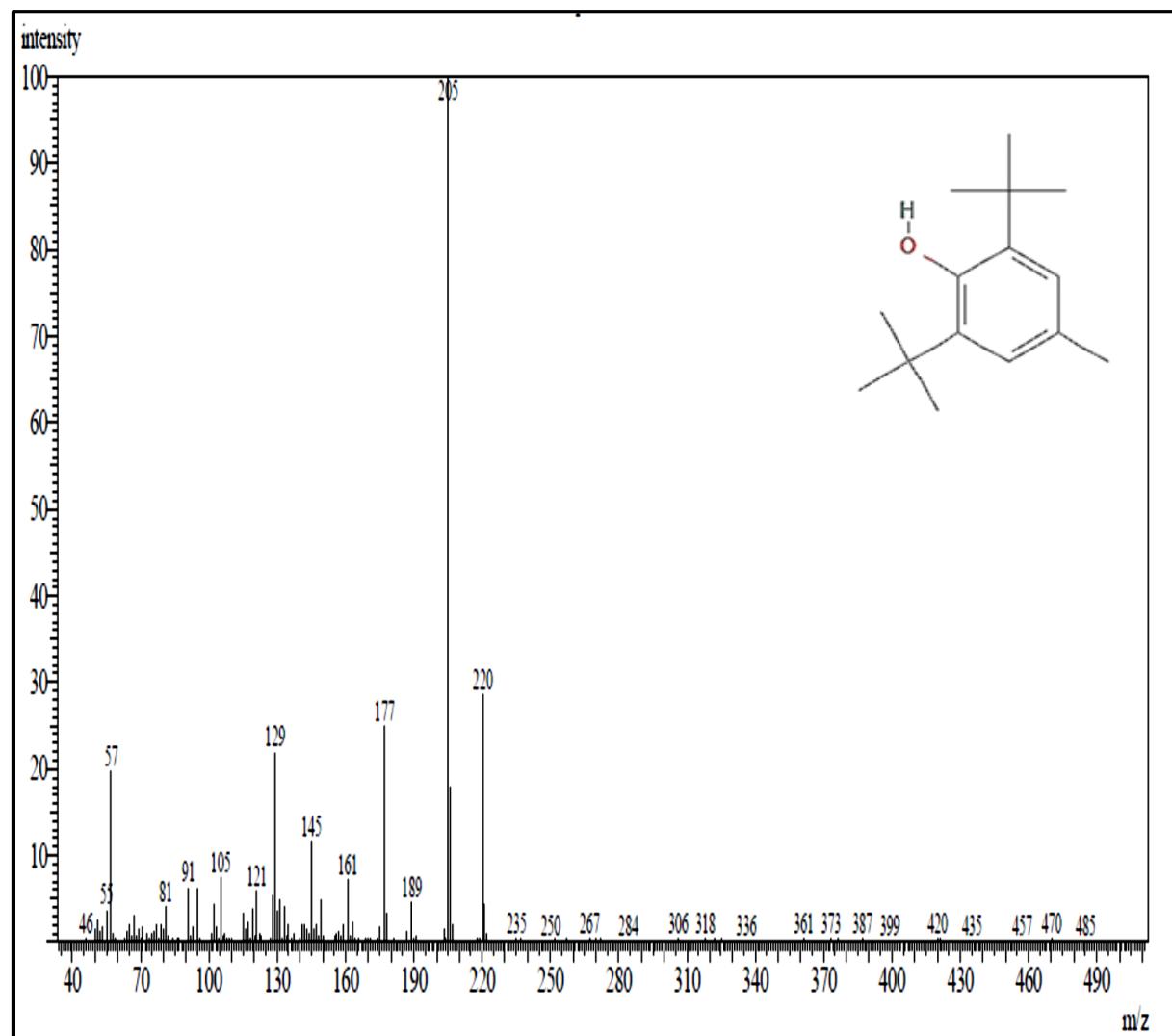


Figure 52. Spectre de masse du composant Hydroxytoluène butylé de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

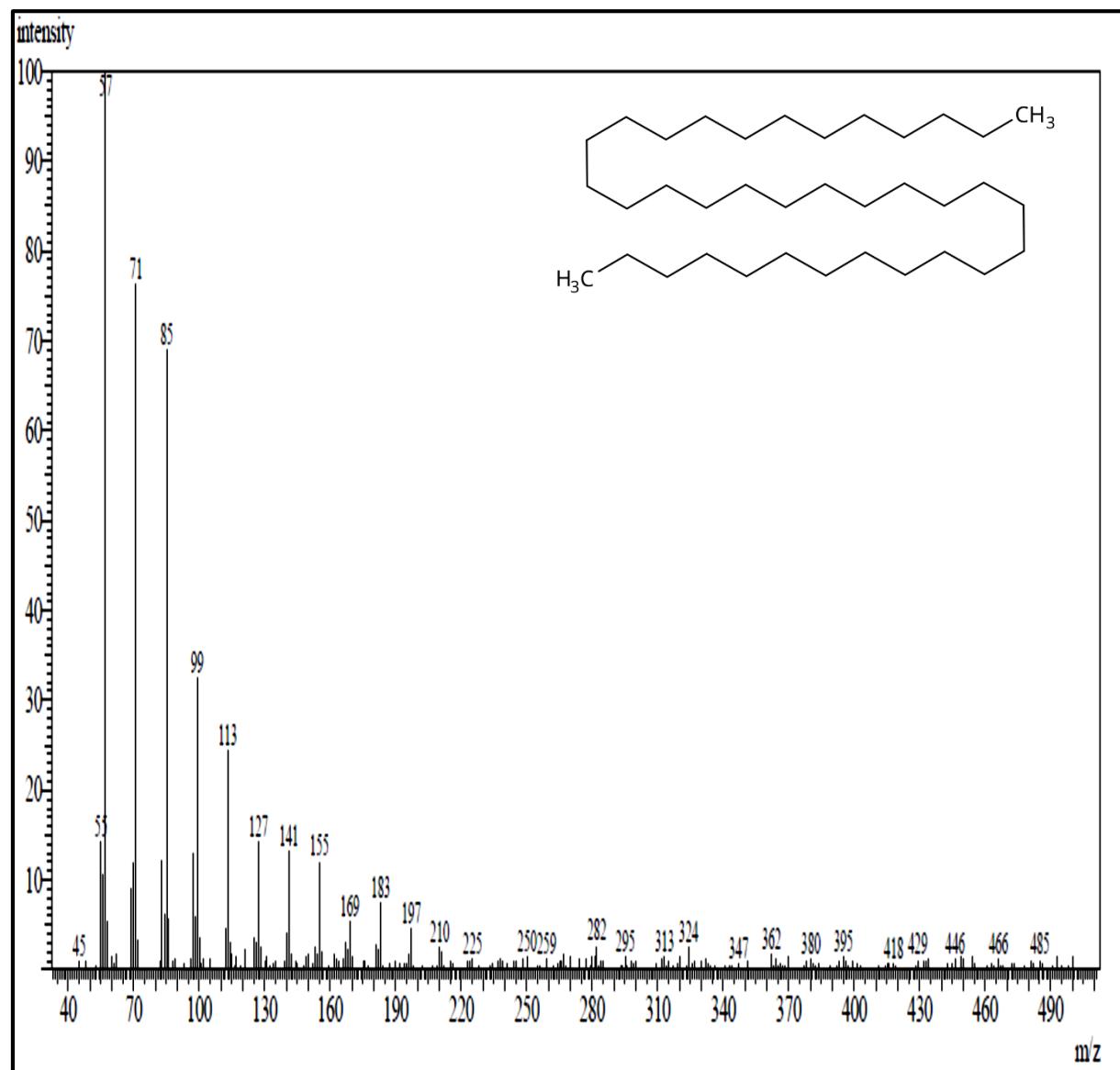


Figure 53. Spectre de masse du composant Hexatriacontane de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

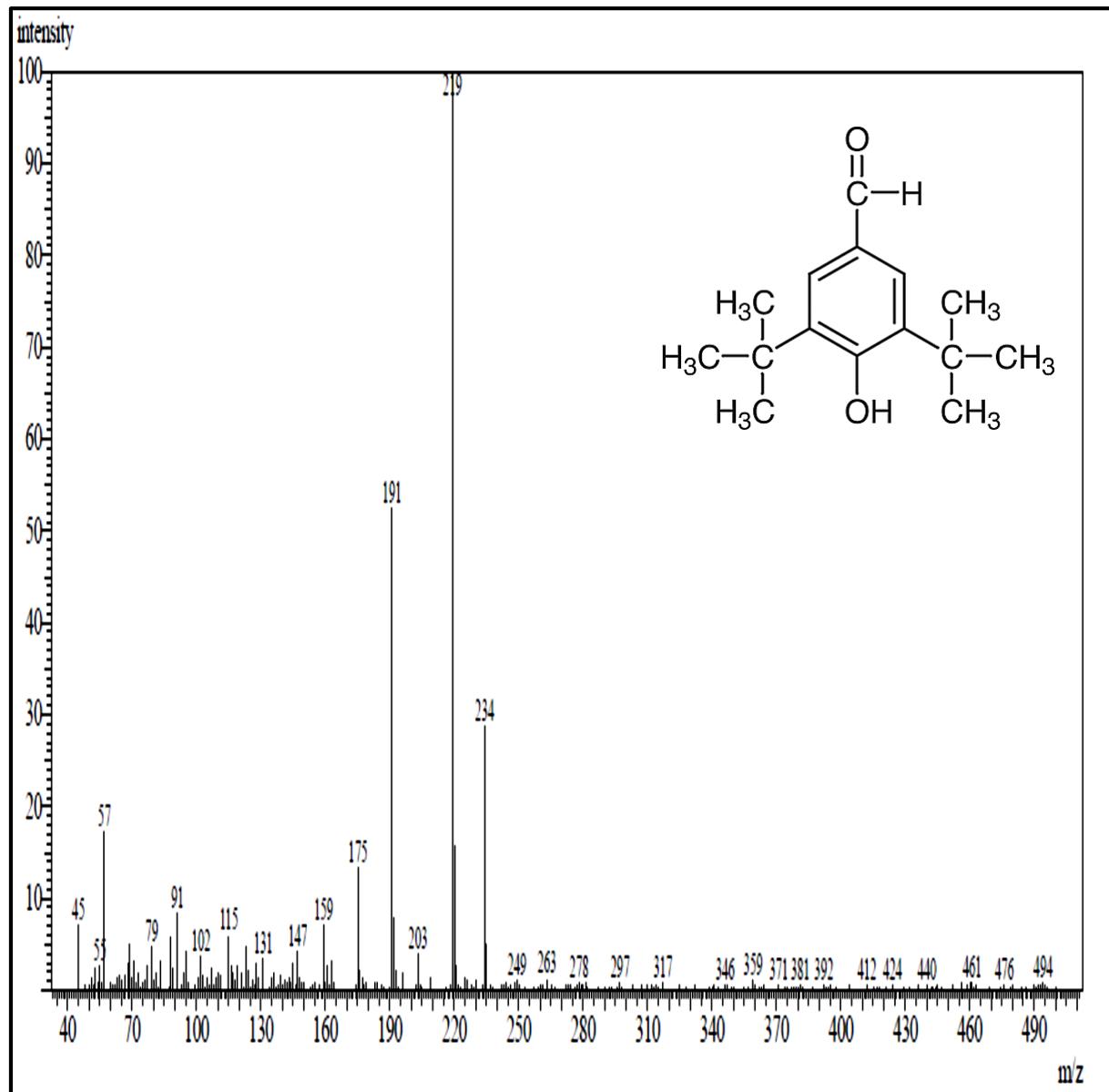


Figure 54. Spectre de masse du composant 3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldehyde de l'huile essentielle des feuilles de *P.harmala*.

Dans une étude d'**Ida et al.**, (2016), l'analyse chromatographique de l'huile essentielle de *P.harmala* de la région de Bousaada a démontré la présence de 45 volatiles constituant 89% de l'huile essentielle totale a montré que ses principaux produits sont (1) l'Eugenol 17,5%, (2) Thymol 7%, (3) Dihydro carveol acetate 6,2%, (4) *epi-a*-Cadinol 5,3%, (5) Carvone 2,7%.

Les variations constatées dans la composition chimique du point de vue qualitatif et quantitatif de nos échantillons par rapport à l'étude d'**Ida et al.**, (2016) peuvent être dues à certains facteurs environnementaux (tels que la composition du sol, la situation géographique et les conditions climatiques), la partie de la plante utilisée, l'âge de la plante et la période de la saison de croissance ou encore à des facteurs génétiques (**Hussain et al., 2009 ; Anwar et al., 2009**). Les méthodes utilisant l'eau peuvent induire une hydrolyse des esters ainsi que des réarrangements, des isomérisations, des racémisations et des oxydations (**Bruneton et al., 1993**).

Khadhri et al. (2011) affirment également que la variation du pourcentage de la composition chimique des huiles essentielles peut s'expliquer par les différences d'origine géographique, de climat, de nature du sol, de rayonnement solaire, d'âge de la plante et d'une partie de son origine plantes.

Tous ces facteurs impliquent l'activation ou l'inactivation de certains groupes enzymatiques, conduisant à la prédominance d'une voie de biosynthèse particulière (**Khadhir et al., 2011**).

Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories : Facteurs intrinsèques, liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement (type de sol ou climat, ...) et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée ; facteurs extrinsèques, en lien avec ou la méthode d'extraction (**Besombes, 2008**).

Facteurs de variabilité des huiles essentielles

Des travaux de recherche ont prouvé que la composition chimique des huiles essentielles est très différente quantitativement et qualitativement. En effet, elle dépend des variations d'ordre naturel (Génétique, localisation, maturité, sol, climat, etc...) ou technologique (Mode de culture ou d'extraction d'huile essentielle de la plante), dont nous citons :

Les facteurs d'origine géographique

Cela permet de connaître l'environnement dans lequel grandit la plante et de caractériser ainsi l'huile essentielle obtenue (**Bowes, 2003** ; **Zahalka, 2010**). Il y a des différences de composition chimique selon le pays d'origine. La composition chimique des huiles essentielles d'une même plante grandissant dans des lieux différents avec changement de situation géographique (Altitude et latitude), avec variation de la nature du sol peut être différente (**Bowes, 2003**). Par exemple, le thym vulgaire à géraniol ne produit cette molécule de géraniol qu'en hiver alors que l'acétate de géranyl la remplacera en été (**Viaed, 1993**).

Les conditions environnementales

Selon les conditions environnementales, le profil chimique peut également être modifié. La qualité et la quantité de lumière, la température, l'indice de pluviométrie, les facteurs édaphiques et le stress, par exemple la contamination par des microorganismes conduisant à la synthèse de phytoalexines, sont autant de facteurs influençant la composition chimique d'une plante donnée (**Tenscher et al., 2005**).

La présence de l'acide carbonique

La présence de certains composés détectés dans le chromatogramme, tels que la carvone en teneur élevée, l'acide carbamique ou encore les hydrocarbures à longues chaînes (C₄₀–C₆₀), ne correspond pas au profil chimique habituellement décrit pour les feuilles de *Peganum harmala*. Ces molécules sont en effet atypiques, voire incompatibles, avec une huile essentielle issue de matériel foliaire. Leur apparition dans les résultats peut s'expliquer par des artefacts analytiques ou des contaminations accidentelles au cours

de la préparation des échantillons ou de l'analyse GC-MS. Plusieurs sources sont possibles : résidus de solvants ou d'huiles dans le système d'injection, mémoire de la colonne chromatographique, relargage de composés plastiques provenant des matériels de manipulation, instabilité thermique de certains composés entraînant des produits de dégradation, ou encore une mauvaise identification spectrale par similitude. De ce fait, ces composés ne doivent pas être interprétés comme des constituants réels de l'huile essentielle des feuilles de *Peganum harmala*, mais plutôt comme des signaux parasites ou des artefacts instrumentaux.

Enfin, il convient de mentionner que certains composants observés lors de l'analyse GC-MS pourraient être liés à des artefacts techniques. Des études complémentaires seraient nécessaires pour confirmer la composition réelle de l'huile essentielle et éliminer toute interférence analytique, notamment en optimisant les conditions d'extraction et les paramètres du GC-MS qui permettra d'établir un profil chimique encore plus précis et représentatif des feuilles de *Peganum harmala*.

II.5. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Peganum harmala* a été évaluée par la méthode des disques sur scinque souches bactériennes et deux souches de levure. L'estimation de la sensibilité ou de la résistance des espèces bactériennes aux huiles essentielles testées est basée sur la détermination du diamètre des zones d'inhibition.

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que les huiles essentielles de *P.harmala* des deux régions présentent une meilleure activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) que les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*). L'activité antifongique révèle que les huiles essentielles étudiées ont un fort pouvoir inhibiteur contre les deux espèces fongique testées *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*.

Les huiles essentielles des feuilles de *P.harmala* de deux régions a bonne activité inhibitrice in vitro contre les micro-organismes testés. Cependant, les micro-organismes n'ont pas montré de même sensibilité à l'huile essentielle.

Cette huile essentielle a une forte activité antibactérienne contre bactéries à Gram positif, *Staphylococcus aureus* (inhibition zone 36 mm CMI : 10,5 µg/ml et 33 mm CMI : 11,5 µg/ml) et *Bacillus cereus*, (zone d'inhibition 21,7 mm CMI : 15 µg/ml et 18 mm CMI : 17,5 µg/ml) et antifongique très puissant, *Candida albicans* (zone d'inhibition 25 mm CMI : 09,0 µg/ml et 22,5 mm CMI : 11,5 µg/ml) et *Aspargillus brasiliensis* (inhibition zone 18 mm CMI : 7,5 µg/ml et 17,5 mm CMI : 10,5 µg/ml). Les huiles essentielles ont une activité antibactérienne modérée contre bactérie Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* (inhibition zone 10,5 mm CMI : 19,5 µg/ml et 8,5 mm CMI : 21 µg/ml), *Pneumonie Klebsiella* (zone d'inhibition 13,5 mm CMI : 17,5 µg/ml et 12 mm CMI : 18,5 µg/ml), *Escherichia coli* (inhibition zone 17 mm CMI : 14,5 µg/ml et 15,5 mm CMI : 12 µg/ml) due à la présence de barrière lipopolysaccharidique (LPS), qui a un rôle dans la protection des bactéries contre les agents antibactériens (**Toure et al., 2015**).

Mode d'action des HEs contre les bactéries

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactéria (**Oussalah et al., 2007**).

Les huiles essentielles sont extraites soit des feuilles, des graines, des écorces, des racines ou d'autres structures spécialisées. Une huile essentielle est un mélange complexe de plusieurs composés d'arômes volatils qui appartiennent aux différentes classes de la chimie organique : phénols (ex : carvacrol), hydrocarbures (composés terpéniques comme le limonène), alcools (ex : linalol), aldéhydes (ex : cinnamaldéhyde), cétone (ex : menthone), esters (ex : acétate de linalyle) et éthers. La plupart de ces composés est dotée de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes : carvacrol (origan, sarriette), eugénol (feuille de cannelle de Ceylan, clou de girofle), linalool (coriandre), cynamaldéhyde (cannelle de Chine), thymol (thym) (**Oussalah et al., 2006**).

La composition des huiles essentielles d'une même espèce varie selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte, la partie de la plante utilisée... Par conséquent, leurs propriétés antimicrobiennes varient également. Il est donc important de sélectionner une huile essentielle standardisée dont les composants actifs sont clairement identifiés et quantifiés (**Oussalah et al., 2006**)

D'autres facteurs influencent les propriétés antimicrobiennes des huiles. Selon les aliments, certains facteurs comme la température, les conditions de stockage, le pH ou la composition de l'aliment, peuvent avoir une influence sur l'action des huiles. Il est établit que l'efficacité de l'huile augmente avec la diminution du pH de l'aliment, de la température de stockage ou encore de la quantité d'oxygène dans l'emballage. Cela est d'autant plus intéressant que les quantités d'huiles nécessaires pour le contrôle de la croissance bactérienne dans les aliments conservés à basse température pourraient être réduites. Il est également prouvé qu'une même huile sera plus efficace dans un aliment pauvre en gras et/ou en protéines. Les fortes teneurs en eau et en sels d'un aliment vont aussi favoriser l'action de l'huile essentielle, alors qu'une structure gélatineuse va au contraire la limiter (**Oussalah et al., 2004**)

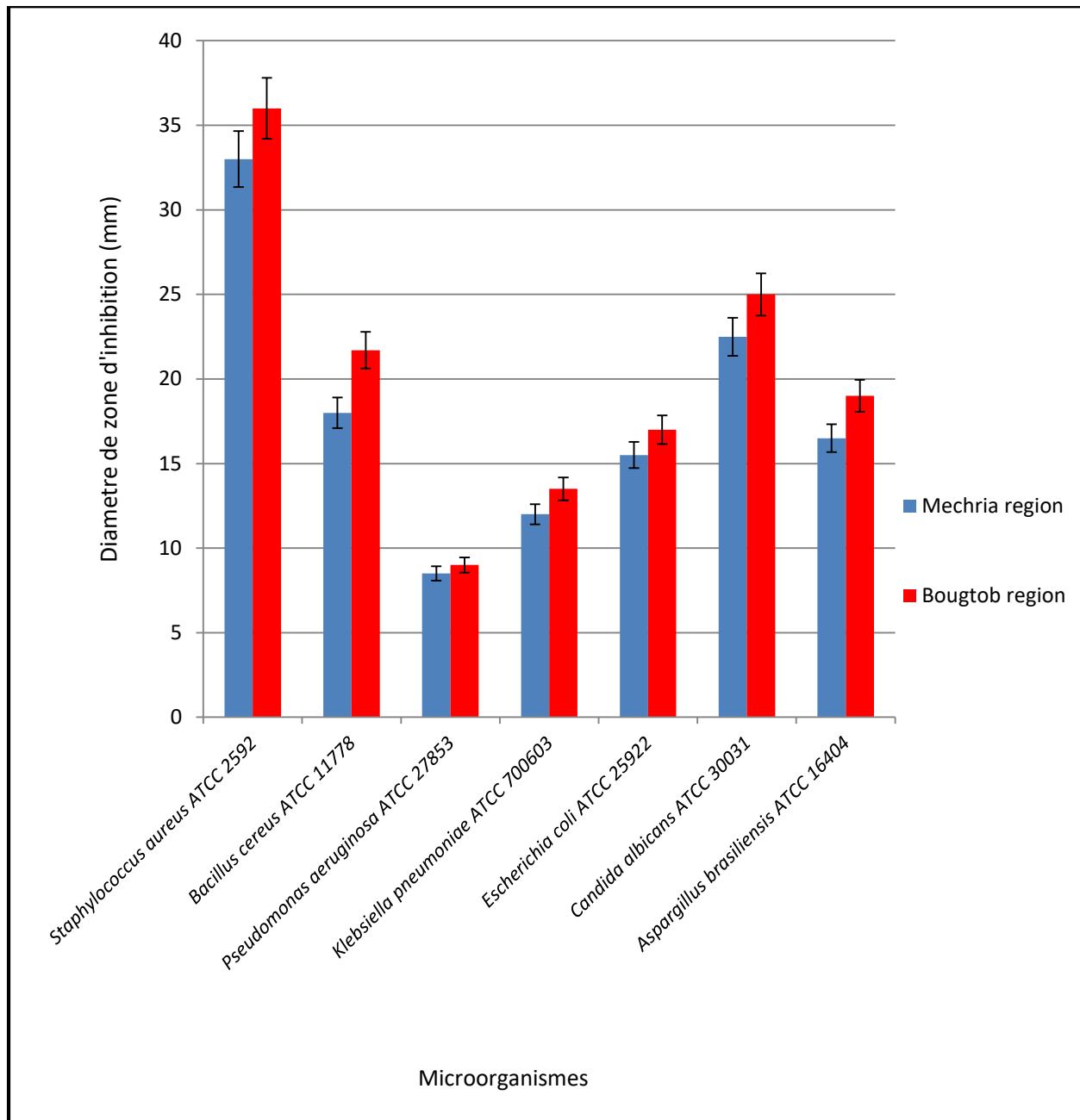


Figure 55. Zones d'inhibition de la croissance (mm) utilisant la technique de contact direct dans un milieu gélosé pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *P.harmala*.

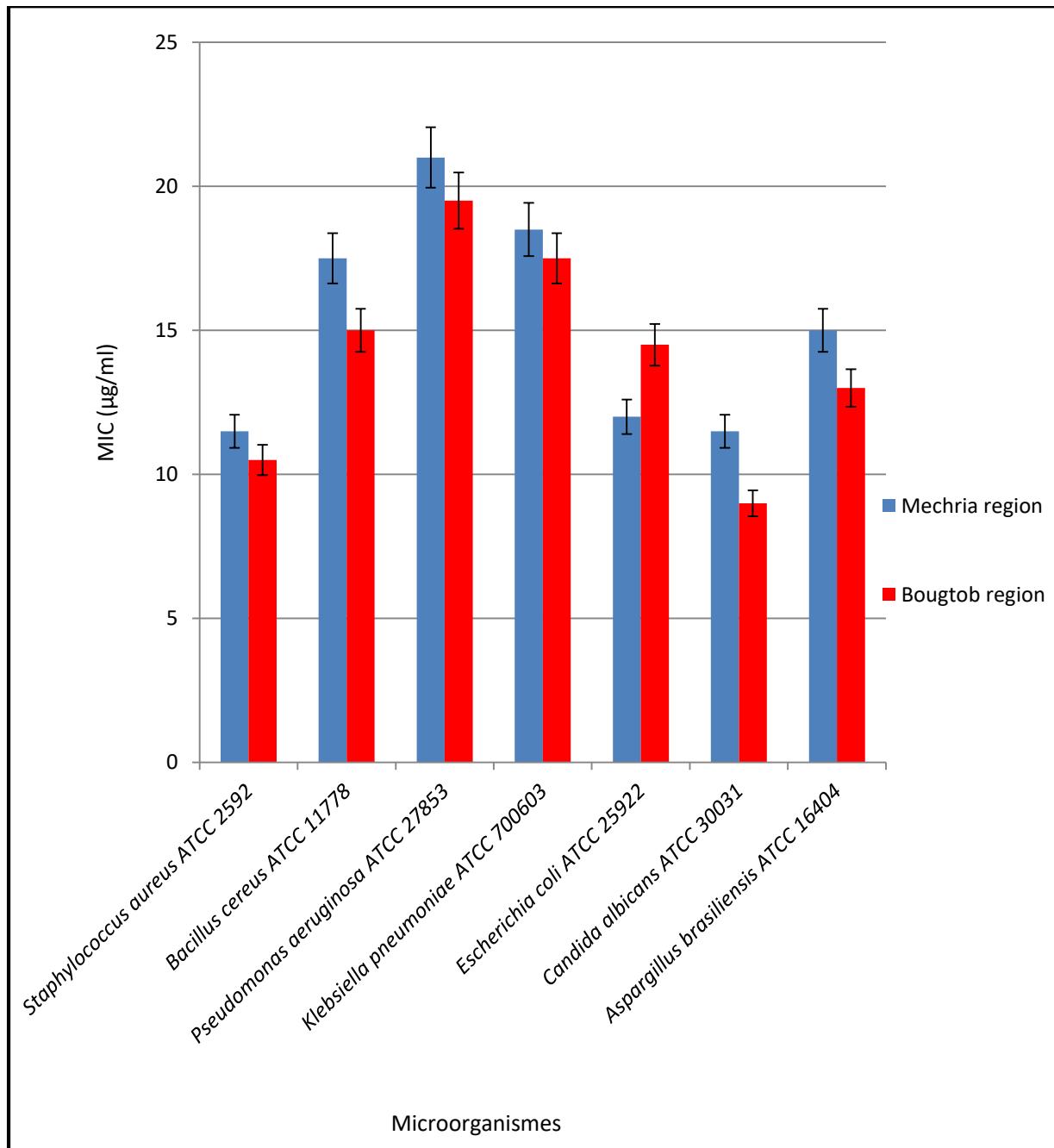


Figure 56. CMI ($\mu\text{g/ml}$) utilisant la méthode de microdilution dans 96 plaques microlitres multiparois montrant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *P.harmala*.

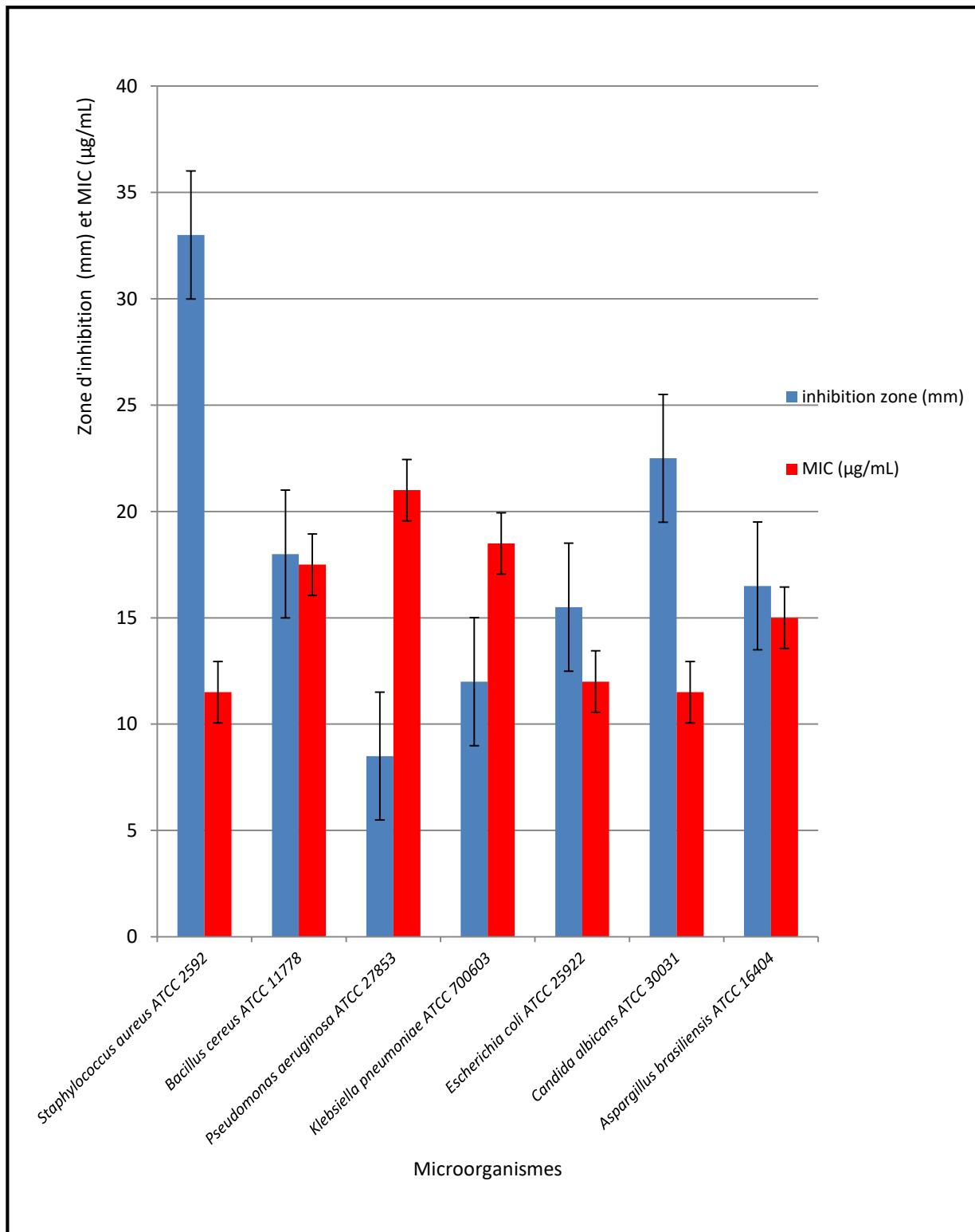


Figure 57. Comparaison du diamètre de la zone d'inhibition et de la CMI pour les bactéries/champignons individuels pour la région de Mechria.

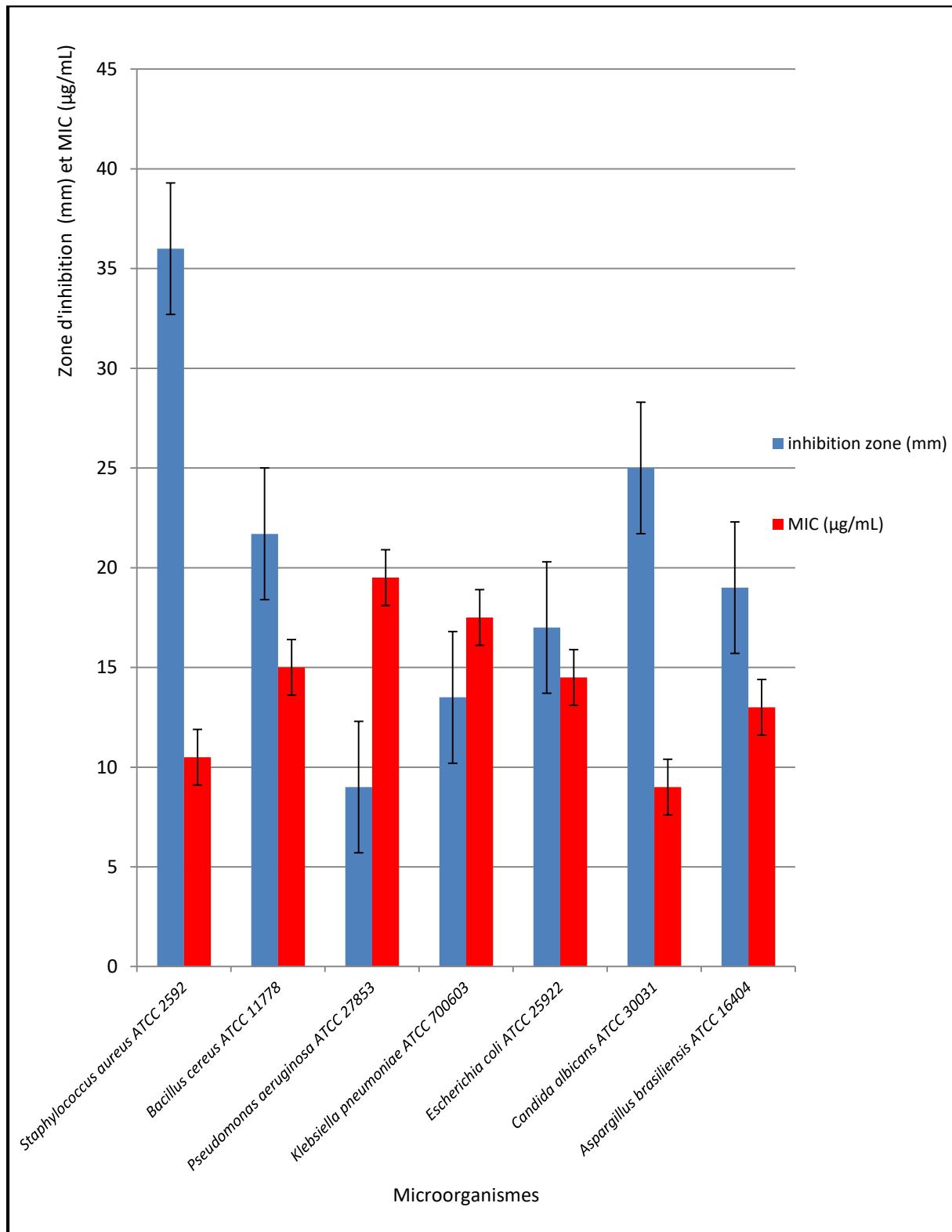


Figure 58. Comparaison du diamètre de la zone d'inhibition et de la CMI pour les bactéries/champignons individuels pour la région de Bougtob.

Ce pouvoir antibactérien des HEs des deux régions élevé contre les quatre souches *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* par rapport au *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* est généralement due au gram des souches car les bactéries Gram négatif sont connues pour leur résistance par rapport aux bactéries Gram positif grâce à la structure particulière de leur membrane externe. Cette dernière délimite chez les bactéries à gram négatif un espace périplasmique contenant quelques feuillets de peptidoglycane. Elle a une composition lipidique asymétrique exposant des lipopolysaccharides au milieu extérieur. Cette organisation constitue une barrière très efficace. (**Akbli et al., 2016, Bouzid, D. 2017. Salvador, D. 2018**)

L'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle de *P.harmala* du sud de l'Algérie a été démontrée contre cinq bactéries et champignons, cette essence a montré une forte activité antimicrobienne contre toutes les souches testées. Ce grand pouvoir est attribué principalement à leur teneur élevée en terpènes oxygénés (Carvone, Phytol et Acide Laurique).

Toutefois, les produits des métabolites secondaires contenant de l'oxygène, tels que les phénols, tendent à afficher une forte activité antimicrobienne. Les groupes hydroxyles sont censés contribuer à la perturbation normale du transport d'ions à travers la membrane cytoplasmique (**Ultee et al., 2002**) et dans l'inactivation des enzymes microbiennes (**Burt, 2004**).

Selon **Benchaar, 2011** l'hydrophobie semble être cruciale pour l'activité antimicrobienne. Cela signifie que les huiles essentielles seront préférentiellement une partition à partir de phase aqueuse dans la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique où elles s'accumulent. C'est au sein de la bicouche lipidique que les huiles essentielles sont considérées actives sur un ou plusieurs de leurs effets antimicrobiens en modifiant la perméabilité membranaire et ainsi de perturber les processus de transport d'ions et d'interagir avec les protéines membranaires ou d'autres composants cytoplasmiques.

L'action des huiles essentielles obtenue est soit médiatisée au sein de la membrane cytoplasmique, soit diffusée dans le cytoplasme. Comme les huiles essentielles sont des mélanges de plusieurs métabolites secondaires, il est probable qu'il y ait un certain nombre de mécanismes d'action.

Enfin, on peut dire que le traitement d'une infection se fait dans la plupart des cas, à travers une antibiothérapie, qui a pour résultat une guérison quasi instantanée. Mais un des effets secondaires de ce traitement est la destruction d'une partie de la flore saprophyte en charge de notre immunité. Le malade peut alors entrer dans un cercle vicieux où, plus il prendra d'antibiotiques, plus son immunité diminuera et plus le risque de récidive infectieuse sera important.

Différentes publications soulignent que les huiles essentielles respectent la flore intestinale.

Avec l'apparition de germes résistant même aux antibiotiques les plus puissants, la popularité de l'huile essentielle est en train de refaire surface. En face de ces résultats encourageants, des études supplémentaires sur un plus grand spectre d'activité antimicrobienne des souches seront nécessaires. En fait, l'isolement des composants d'huiles essentielles sont en progrès.

II.6. Analyse computationnelle de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Peganum harmala* (Molecular Docking)

II.6.1. Simulations de docking moléculaire

Les résultats du docking moléculaire soulignent le rôle crucial des modifications structurelles dans l'amélioration de l'affinité des ligands envers leurs cibles biologiques. Ces résultats offrent des perspectives prometteuses pour la conception rationnelle de nouveaux agents thérapeutiques sur mesure, tout en minimisant potentiellement la dépendance à des procédures expérimentales coûteuses et chronophages (**Kitchen, D. B et al., 2004 ; Pagadala, N. S et al., 2017**).

La sélection des protéines a été guidée par des critères spécifiques de qualité structurelle. Initialement, leurs conformations tridimensionnelles ont été élucidées par diffraction des

rayons X (XRD), la technique expérimentale la plus précise pour l'identification de la structure des protéines. Les entrées correspondantes dans la Banque de Données des Protéines (PDB) présentent des résolutions inférieures à 2,50 Å (**F.E. Kalai et al., 2021**), indiquant une haute précision structurelle (**Tableau 15**). De plus, les structures protéiques choisies incluent des valeurs R-free, un paramètre clé pour évaluer la fiabilité des modèles cristallographiques.

Toutes les protéines sélectionnées présentaient des valeurs R-free inférieures à 0,45 (**C. Abad-Zapatero et al., 2012**), reflétant une forte concordance entre les données expérimentales et les modèles structurels (**voir Tableau 15**).

Le tableau 13 présente les résultats obtenus pour le score de liaison (kcal/mol) et la constante d'inhibition (μM) de chaque composé avec diverses protéines pour des activités antibactériennes. Une valeur d'énergie de liaison négative indique une interaction probable entre le ligand et le récepteur.

De plus, les principales molécules présentes dans les huiles essentielles de *Peganum harmala* sont plus efficaces si leur constante d'inhibition (K_i) est plus faible.

Les résultats du docking moléculaire, tels que décrits dans le **Tableau 16**, s'alignent bien avec les résultats expérimentaux précédemment discutés des tests biologiques, indiquant une forte corrélation entre les deux ensembles de données. La structure des composés, en particulier les types et les positions des substituants, influence de manière significative leur activité biologique.

Tableau 15. Noms, codes, résolution R-free des différentes protéines utilisées et les dimensions de la boîte de chaque site actif.

Bactéries	Code id	Nom de Protéine	Resolution	Valeur R	Dimension box
Bactéries Gram-positive (G+)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	6JIW	Structure cristalline de <i>S. aureus</i> CntK avec la mutation C72S	1.58	0.210	$x = 16$, $y = 22$, $z = 4$
<i>Bacillus cereus</i>	7NMQ	Composant de la toxine HblL1 de <i>Bacillus cereus</i>	1.36	0.2	$x = 26$, $y = 110$, $z = 23$
Bactéries Gram-negative (G-)					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4WEK	Structure cristalline de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PBP3 avec un vinyle substitué en R4 monocarbam	1.74	0.207	$x = 3$, $y = 39$, $z = 17$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5HSG	Structure cristalline d'un transporteur ABC Protéine de liaison aux solutés de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KPN_01730, cible EFI-511,059), structure APO ouverte	1.30	0.174	$x = 1$, $y = 39$, $z = 82$
<i>Escherichia coli</i>	4PNC	E.coli méthionine aminopeptidase en complexe avec l'inhibiteur 7-méthoxy-2-méthylène-3,4-dihydronaphtalène-1(2H)-one	1.65	0.186	$x = 33$, $y = 43$, $z = 8$
<i>Candida Albicans</i>	3DRA	<i>Candida albicans</i> protein geranylgeranyltransferase-I complexed with GGPP	1.80	0.231	$x = 27$, $y = 42$, $z = 30$

Tableau 16. Score de liaison (kcal/mol) et constante d'inhibition (μM) des principales molécules présentes dans l'huile essentielle de *Peganum harmala* avec différentes protéines pour l'activité antibactérienne.

Bactéries	bactéries Gram-positive (G+)					bactéries Gram-négative (G-)				
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Escherichia coli</i>	
Composants	ΔG (kcal/mol)	Ki (μM)	ΔG (kcal/mol)	Ki (μM)	ΔG (kcal/mol)	Ki (μM)	ΔG (kcal/mol)	Ki (μM)	ΔG (kcal/mol)	Ki (μM)
Carvone	-5.7	66.35	-6.3	24.10	-5.6	78.55	-5.6	78.55	-5	216.25
Phytol	-5	216.25	-4.6	424.79	-5.2	154.30	-4.7	358.81	-4.6	424.79
Acide Carbamique	-3.6	2297.10	-4	1169.44	-3.5	1050	-3.4	3219.45	-3.7	1940.35
Acide Laurique	-4.7	358.81	-3.8	1639	-4.2	834.40	-3.8	1639	-3.9	1384.45
Thymol	-5.7	66.35	-6.7	12.27	-5.6	78.55	-6.3	24.10	-5	216.25
Tetrapentacontane	-5.2	154.30	-3.7	1940.35	-4.7	358.81	-3.3	3811.38	-3.5	2719.45
2-amino benzaldehyde	-5.3	130.34	-6.5	17.20	-4.9	256.02	-5.6	78.55	-4.8	303.1
Dihydroactinidiolide	-7	7.39	-5.1	182.67	-6	39.99	-5.4	110.09	-5.5	92.9

Pour les bactéries Gram-positives, les composés testés contre *Staphylococcus aureus*, le dihydroactinidiolide s'est avéré être la molécule la plus prometteuse. Il présente la meilleure affinité de liaison de (-7 kcal/mol) et une faible constante d'inhibition Ki de 6,53 µM, indiquant une interaction forte et stable avec la cible bactérienne. L'analyse des interactions moléculaires montre que la dihydroactinidiolide forme plusieurs liaisons hydrogène avec les résidus polaires de la protéine, en plus d'établir des interactions hydrophobes significatives, ce qui contribue à une bonne stabilisation du complexe ligand-récepteur. De plus, sa structure lui permet de s'adapter parfaitement à la cavité du site actif, optimisant ainsi son efficacité de liaison. Ces résultats suggèrent que la dihydroactinidiolide a un fort potentiel en tant qu'agent antimicrobien ciblant des souches bactériennes Gram-positives telles que *Staphylococcus aureus* (**voir figure 59**).

Parmi tous les composés étudiés, le thymol s'avère être la molécule avec la plus haute affinité de liaison pour la souche de *Bacillus cereus*, avec une énergie libre de liaison de -6,7 kcal/mol et une constante d'inhibition Ki de 11,8 µM. Ces résultats indiquent une forte capacité de liaison au site actif de la cible bactérienne. De plus, l'analyse des interactions montre que le Thymol établit plusieurs liaisons spécifiques, en particulier des liaisons hydrogène et hydrophobes, ce qui favorise une stabilisation efficace du complexe ligand-récepteur. En comparaison, le 2-amino benzaldéhyde présente également une bonne affinité ($\Delta G = -6,5$ kcal/mol et $Ki = 15,2$ µM), avec des interactions stabilisatrices, mais légèrement moins prononcées que celles du thymol. Ainsi, le thymol semble être le composé le plus prometteur pour l'activité antibactérienne *contre Bacillus cereus*, en raison de sa forte affinité et de la qualité de ses interactions moléculaires. (**voir figure 60**)

Et contre *Klebsiella pneumoniae*, le thymol s'est avéré être l'un des ligands les plus prometteurs en raison de sa haute affinité de liaison avec la protéine cible, reflétée par une énergie de liaison ($\Delta G = -6,3$ kcal/mol) et une constante d'inhibition $Ki = 24,10$ µM. L'analyse des interactions moléculaires en 2D montre que le Thymol établit des liaisons hydrogène spécifiques, ce qui contribue à la stabilité du complexe ligand-récepteur. De plus, des interactions hydrophobes significatives sont situées au sein du site actif de la protéine. Ces interactions hydrophobes améliorent l'ancrage du ligand dans la cavité de

liaison. L'orientation spatiale du Thymol, favorisée par la présence de son noyau aromatique et de son groupe hydroxyle, permet à la molécule de s'adapter parfaitement à la topologie de la poche active, augmentant ainsi sa sélectivité et son efficacité inhibitrice. Cette combinaison d'interactions suggère que le Thymol pourrait être un bon candidat en tant qu'inhibiteur des protéines essentielles à la survie de *Klebsiella pneumoniae*.

L'analyse des interactions moléculaires entre les composés dérivés de *Peganum harmala* et la protéine cible (**voir figure 61**)

Dans les bactéries Gram-négatives, nous avons testé huit molécules contre la souche de *Pseudomonas aeruginosa*, la molécule Dihydroactinidiolide a montré la meilleure affinité de liaison, avec une énergie libre de ($\Delta G = -6$ kcal/mol) et une constante d'inhibition $K_i=39,99$ μM . Cette forte affinité est attribuée à la présence de plusieurs interactions stabilisatrices, telles que des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes observées dans le site actif de la protéine, comme le montre la figure. En deuxième position, le Thymol se distingue avec une valeur de ΔG de (-6,5 kcal/mol) et $K_i = 78,55$ μM , indiquant également une bonne capacité de liaison. Il forme notamment des liaisons hydrogène avec des résidus polaires, en plus de contacts hydrophobes qui renforcent la stabilité du complexe. Le carvone présente des valeurs identiques à celles du thymol, suggérant une efficacité comparable. D'autre part, des molécules comme le Tétrapentacontane ($\Delta G= -4,7$ kcal/mol, $K_i =358,81$ μM) et le 2-aminobenzaldéhyde ($\Delta G=-4,9$ kcal/mol, $K_i =265,02$ μM) montre une affinité plus faible, probablement en raison d'un nombre réduit d'interactions spécifiques dans le site actif. Ainsi, le dihydroactinidiolide s'avère être le ligand le plus prometteur contre *Pseudomonas aeruginosa*, suivi de près par le Thymol et le Carvone, qui démontrent également un bon potentiel antibactérien (**voir figure 62**).

Escherichia coli a permis l'évaluation de leur affinité à travers les valeurs de l'énergie libre de liaison (ΔG) et de la constante d'inhibition (K_i). Parmi les huit molécules testées, le Dihydroactinidiolide s'est avéré être le plus efficace, affichant un ΔG de (-5,5 kcal/mol) et un K_i de 92,9 μM . Ces résultats indiquent une interaction forte, stable et

favorable entre ce ligand et la protéine bactérienne, en faisant un candidat prometteur pour le développement d'agents antimicrobiens (**figure 63**).

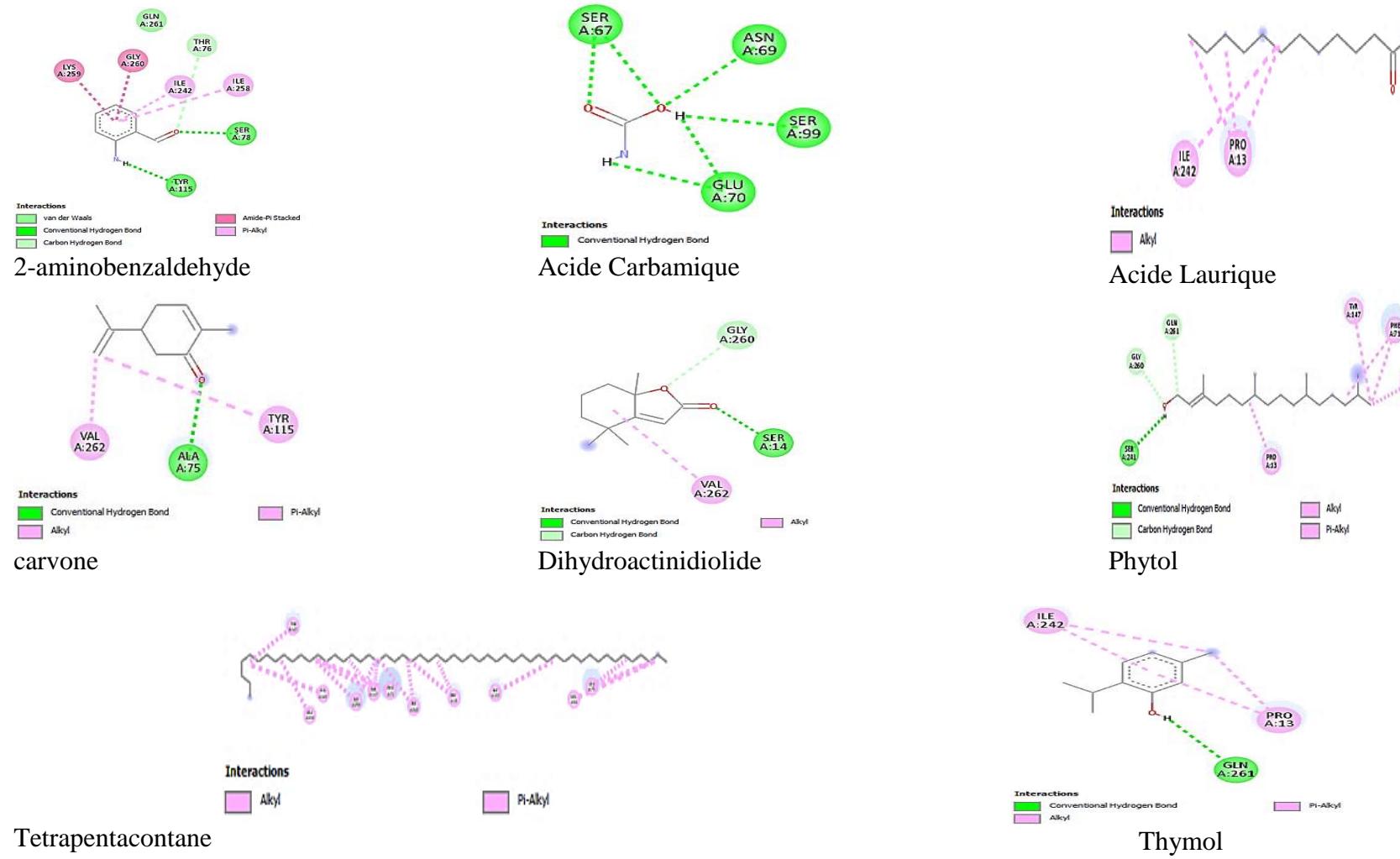


Figure 59. Diagramme d'interaction récepteur-ligand 2D pour les principales molécules de *P.harmala* via *Staphylococcus aureus*

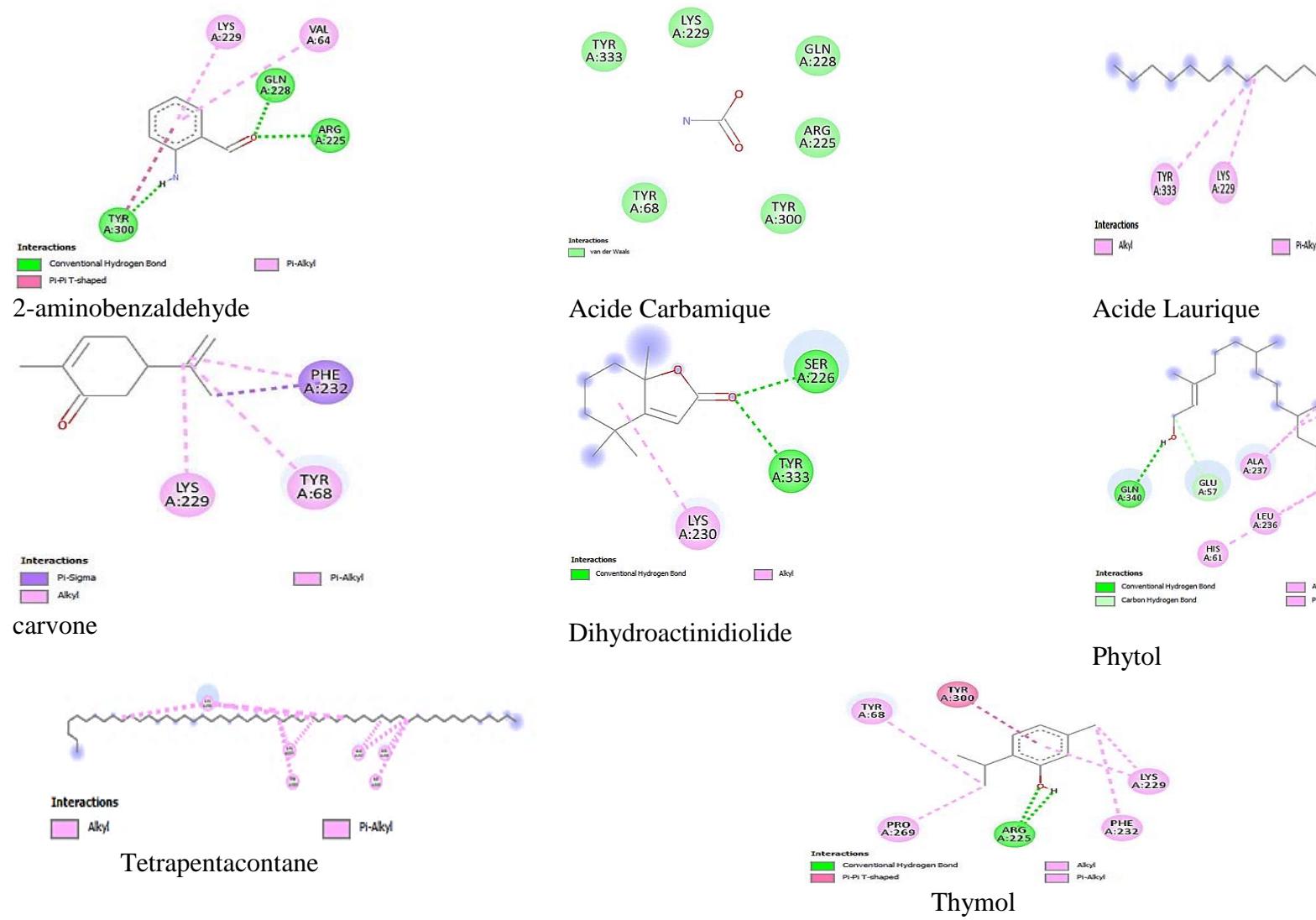


Figure 60. Diagramme d'interaction récepteur-ligand 2D pour les principales molécules de *P.harmala* via *Bacillus cereus*

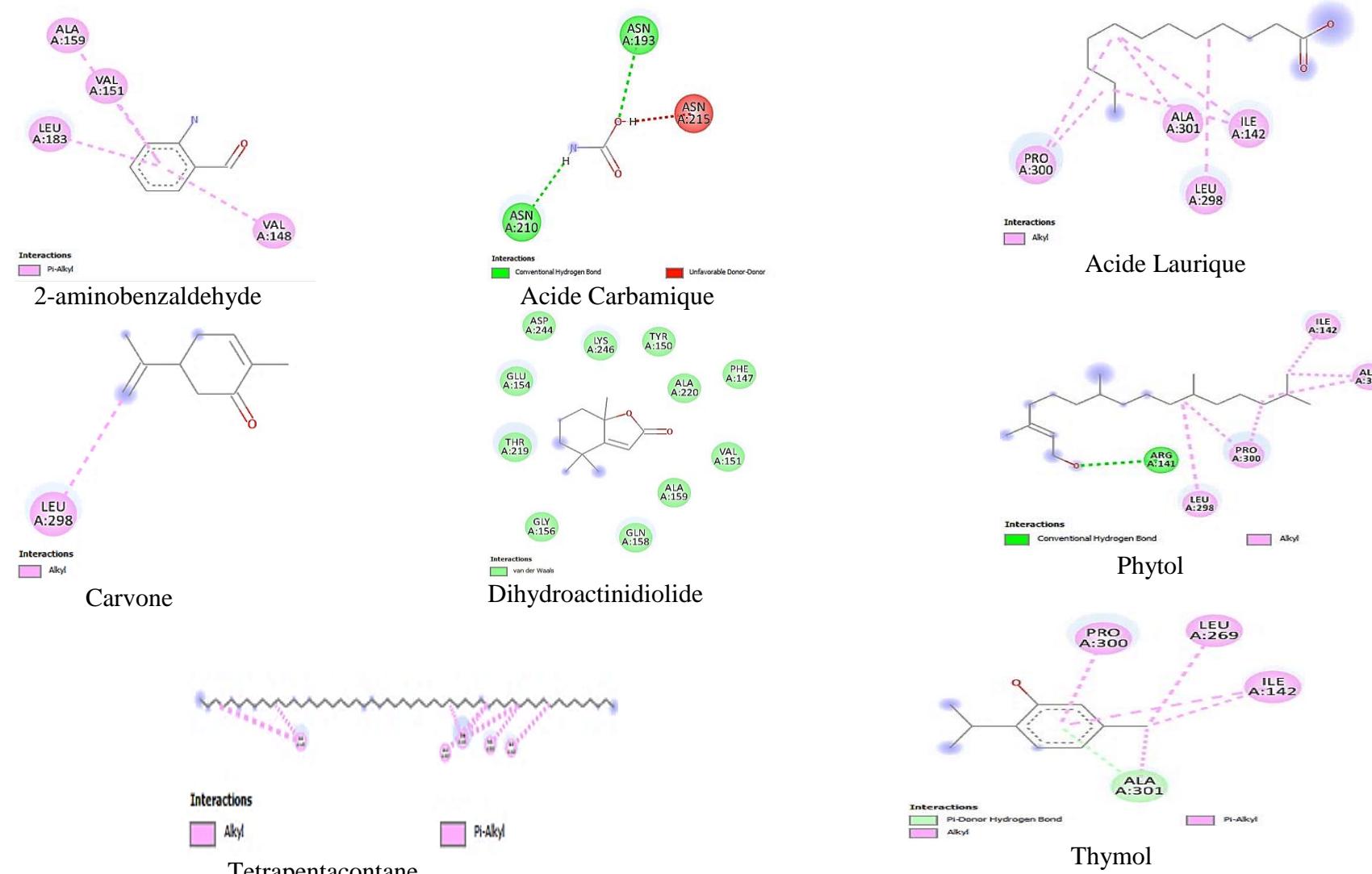


Figure 61. Diagramme d'interaction récepteur-ligand 2D pour les principales molécules de *P.harmala* via *Klebsiella pneumoniae*.

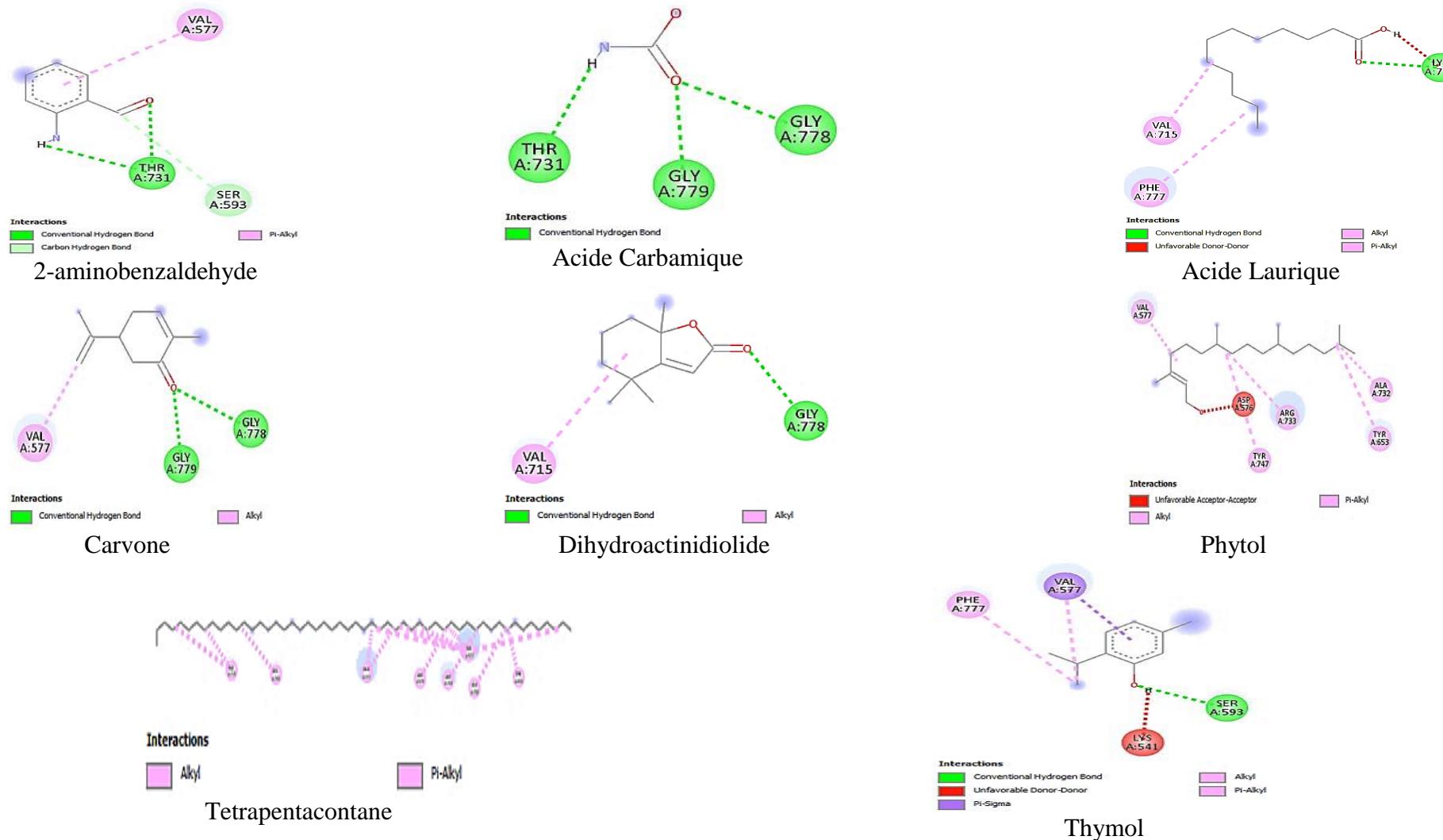


Figure 62. Diagramme d'interaction récepteur-ligand 2D pour les principales molécules de *P.harmala* via *Pseudomonas aeruginosa*.

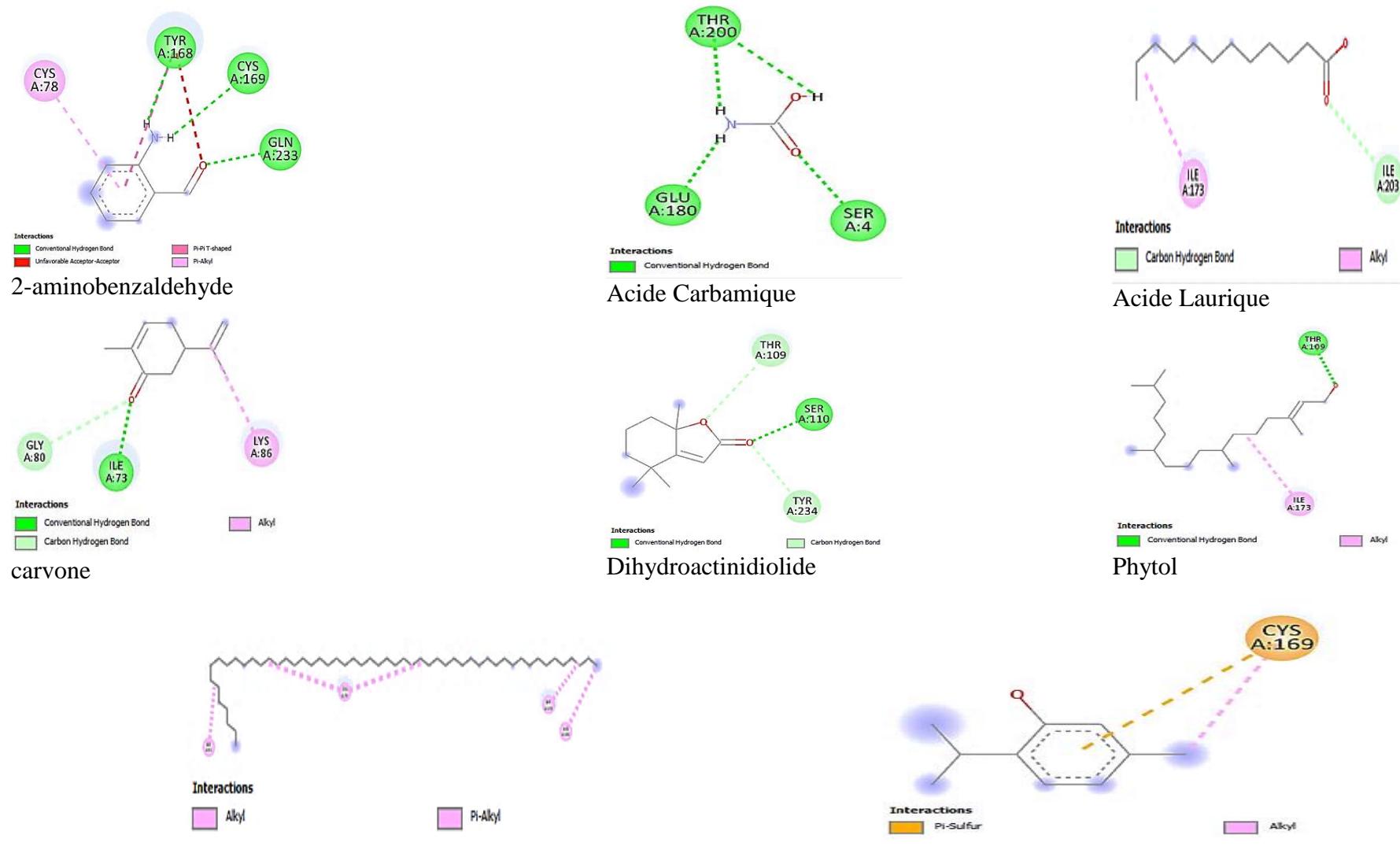


Figure 63. Diagramme d'interaction récepteur-ligand 2D pour les principales molécules de *P.harmala* via *Escherichia coli*

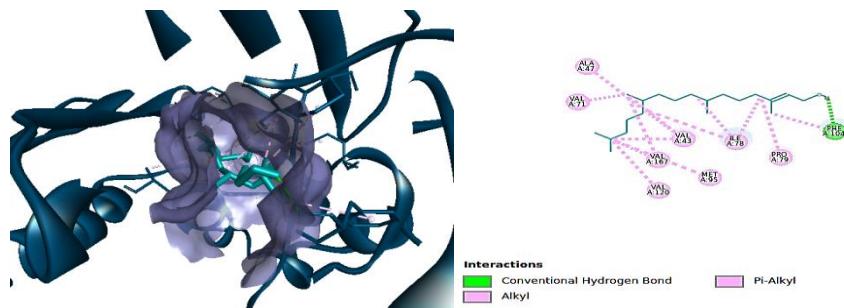
Tableau 17. Résultats de l'amarrage moléculaire de l'ampicilline standard et les principaux composés de l'HE de *Peganum harmala* contre la gyrase de l'ADN d'*E.coli* et de *S.aureus*.

Composant	<i>E.coli</i> DNA gyrase	<i>S.aureus</i> DNA gyrase
	(PDB ID: 3G7E) (ΔG)	(PDB ID : 3G75) (ΔG)
Carvone	-6.1	-5.5
Phytol	-7.5	-4.3
Acide Carbamique	-3.5	-3.3
Acide Laurique	-5.0	-4.0
Thymol	-5.9	-5.2
Tetrapentacontane	-4.2	-4.0
Dihydroactinidiolide	-7.0	-5.2
2-aminobenzaldehyde	-4.8	-4.1
Phytone	-4.1	-4.2
Butylated-Hydroxytoluene	-6.4	-4.9
Hexatriacontane	-5.5	-4.2
Dotriacontane	-6.3	-4.0
3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldehyde	-5.5	-5.0
Standard ampicillin	-6.0	-6.8

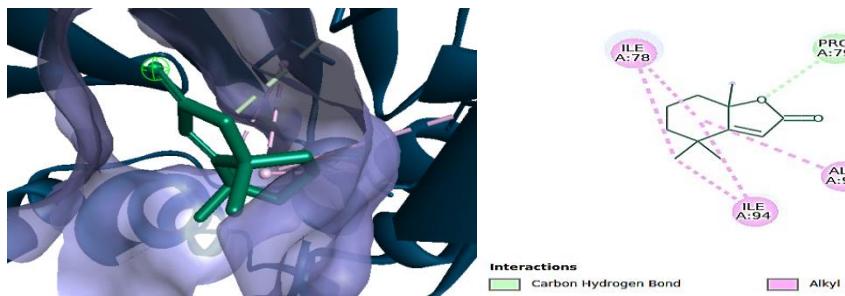
Tableau 18. Les trois meilleurs composés dockés de l'HE de *Peganum harmala* avec l'ampicilline standard contre la gyrase d'ADN d'*E.coli* (PDB : 3G7E) et de *S.aureus* (PDB : 3G75).

Target protéine	Composants	Les trois meilleurs scores de liaison (Kcal/mol)		
		Liaisons-H	Autres interactions	
<i>E.coli</i> DNA gyrase (PDB : 3G7E)	Phytol	-7.5	Phe104	Ala47,Val71,Val120,Val167, Val43,Met95,Ile78,Pro79
	Dihydroactinidiolide	-7.0	Pro79	Ile78,Ile94,Ala90
	Butylated- Hydroxytoluene	-6.4	-	Glu50,Ile94,Ile78,Pro79
	Ampicillin	-6.0	Arg76, Phe104, Asp49,Glu50	Lys103, Ile94,Ile78,Ala90
<i>S. aureus</i> DNA gyrase (PDB : 3G75)	Carvone	-5.5	His143	Val174,Lys78,Arg176, Tyr141,Ile148
	Thymol	-5.2	-	Val165,Ile148,Tyr141, Val174
	Dihydroactinidiolide	-5.2	-	Lys170
	Ampicillin	-6.8	Ser226,Thr212, Ile67,Gln210,Gln66	Glu68

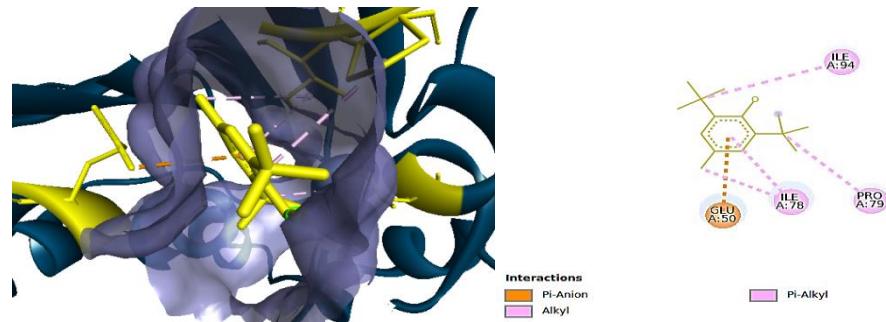
(A)



(B)



(C)



(D)

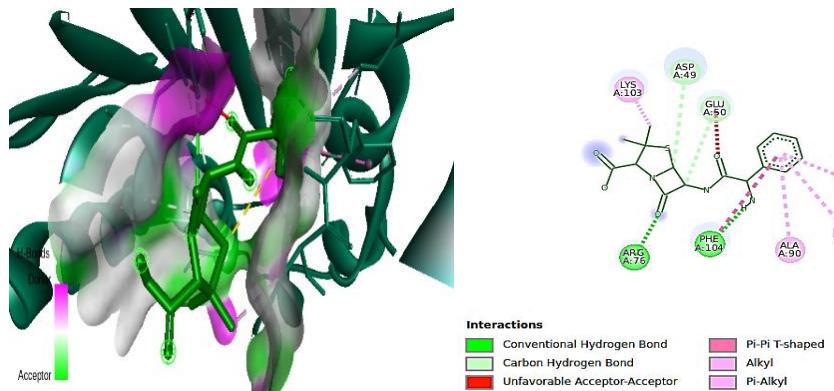
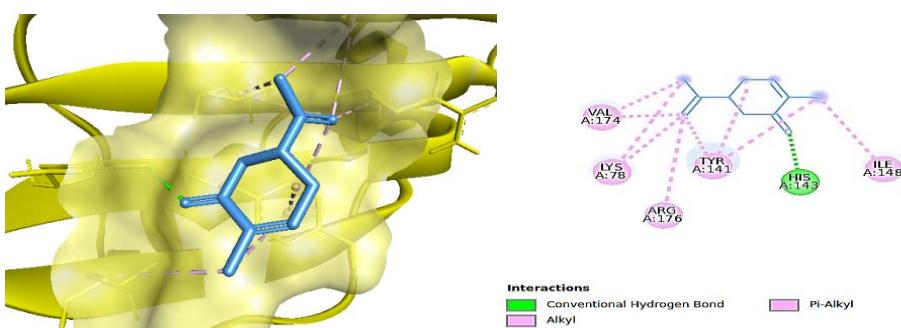


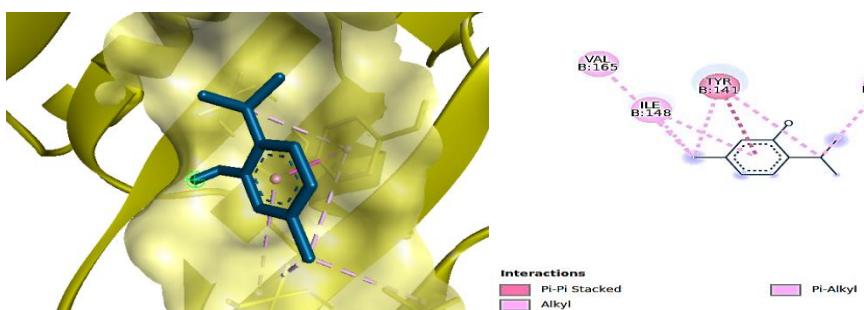
Figure 64. Diagramme d'interaction en 2D et 3D des trois composés les mieux classés de HEs de *P.harmala* et de l'ampicilline standard contre la gyrase d'ADN d'*E. coli* (PDB ID : 3G7E).

(A) Phytol, (B) Dihydroactinidiolide, (C) Butylated-Hydroxytoluene, (D) Ampicillin.

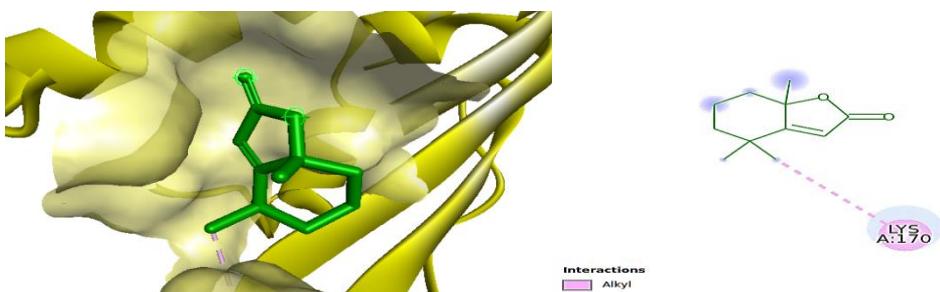
(A)



(B)



(C)



(D)

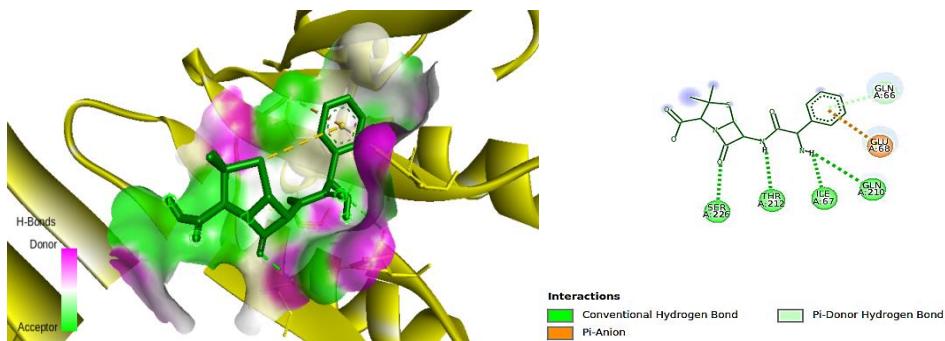


Figure 65. Diagramme d'interaction en 2D et 3D des trois composés les mieux classés des HEs de *P.harmala* et de l'ampicilline standard contre la gyrase d'ADN de *S. aureus* (PDB ID : 3G75). (A) Carvone, (B) Thymol, (C) Dihydroactinidiolide, (D) Ampicilline.

Les bactéries utilisent une large gamme de mécanismes adaptatifs et persistants pour maintenir leur viabilité et soutenir les infections. La topoisomérase de type II, la gyrase à ADN, joue un rôle important chez les bactéries, car elle régule la topologie de l'ADN pendant la réplication et la transcription (Rajakumari *et al.*, 2024). Par conséquent, c'est une cible bien établie pour le développement de médicaments antibactériens. Étant donné les résultats de l'activité antibactérienne contre *E.coli* et *S.aureus* dans la présente enquête, on pense que les composés chimiques extraits entravent l'activité de la gyrase de l'ADN dans les deux souches, contribuant ainsi à l'effet inhibiteur. L'enquête de docking moléculaire a été menée pour évaluer l'affinité de liaison des composés abondants contre les enzymes ADN gyrase d'*E.coli* et de *S. aureus*. Les énergies de liaison (Kcal/mol) pour chaque ligand sont résumées dans **le Tableau 15**. Les trois meilleurs composés de liaison contre l'enzyme cible ont été sélectionnés pour des investigations supplémentaires afin de mettre en évidence le mode de liaison et les interactions avec les acides aminés (**Tableau 16**) (**Figure 64-65**).

Parmi les composés testés, le phytol et le dihydroactinidiolide ont montré les plus fortes affinités de liaison envers la gyrase d'ADN d'*E. coli* (PDB ID : 3G7E) avec un score de docking de (-7,5 Kcal/mol) et (-7,0 Kcal/mol), respectivement. Ensuite, le butylhydroxytoluène et le dotriacontane ont montré des interactions précieuses contre l'enzyme cible avec un score de liaison similaire de (-6,4 Kcal/mol). Cependant, le standard utilisé a montré moins d'efficacité. Compte tenu du score de liaison élevé des trois principaux composés, à savoir le phytol, le dihydroactinidiolide et le butylhydroxytoluène, différentes liaisons ont été établies. Le phytol a formé une liaison hydrogène avec le résidu Phen104, tandis que de multiples forces intermoléculaires telles que des interactions alkyl et Pi-alkyl ont été formées avec les résidus Ala47, Val71, Val120, Val167, Val43, Met95, Ile78 et Pro79.

L'interaction avec le dihydroactinidiolide a montré un bon score (-7,0 Kcal/mol), établissant une liaison hydrogène avec le résidu Pro79 et trois interactions hydrophobes alkyliques avec les résidus Ile78, Ile94 et Ala90. Le butylhydroxytoluène a montré une énergie de liaison comparable, stabilisée par des interactions avec Glu50, Ile94, Ile78 et Pro79. L'antibiotique standard ampicilline a obtenu un score légèrement inférieur (-6,0

Kcal/mol) mais a formé de multiples liaisons hydrogène, notamment avec Arg76, Phe104, Asp49 et Glu50, ainsi que d'autres interactions avec Lys103, Ile94, Ile78 et Ala90.

Concernant l'étude de docking contre la gyrase d'ADN de *S. aureus* (PDB ID : 3G75), le carvone a enregistré la meilleure énergie de liaison de -5,5 Kcal/mol, formant des liaisons hydrogène avec His143, et des contacts hydrophobes avec Val174, Lys78, Arg176, Tyr141 et Ile148. Le thymol a montré des énergies de liaison de -5,2 Kcal/mol, principalement par des forces intermoléculaires telles que des interactions Pi-Pi empilées, alkyl et Pi-alkyl avec les résidus Val165, Ile148, Tyr141 et Val174, tout en manquant de manière notable la formation de liaisons hydrogène.

La dihydroactinidiolide a démontré un score de liaison comparable (- 5,2 kcal/mol) avec une interaction principalement au niveau de Lys170. L'ampicilline standard utilisée a montré une énergie de liaison plus forte de -6,8 Kcal/mol, interagissant positivement avec le site de liaison de la gyrase d'ADN de *S. aureus*, formant de multiples liaisons hydrogène avec Ser226, Thr212, Ile67, Gln210 et Gln66, ce qui a considérablement amélioré l'affinité de liaison, ainsi que des contacts supplémentaires avec Glu68.

Il est bien documenté que les agents pathogènes bactériens dépendent de plusieurs enzymes indispensables pour leur survie. Parmi ceux-ci, la gyrase d'ADN joue un rôle crucial en catalysant la super-torsion négative dépendante de l'ATP de l'ADN circulaire fermé à double brin. En conséquence, la recherche de nouveaux composants inhibiteurs ciblant la gyrase à ADN est un domaine de recherche crucial dans la lutte contre les infections bactériennes. Dans cette étude, les résultats *in silico* s'alignent parfaitement avec l'activité antibactérienne *in vitro*, ajoutant des informations précieuses sur les interactions entre les principaux composés naturels examinés de l'HE de *Peganum harmala* et le site catalytique de la gyrase d'ADN bactérienne. Par exemple, le composé phytol, qui a obtenu le meilleur score, a montré une activité puissante contre la gyrase d'ADN d'*E. coli*. Cette interaction suggère que ce composé pourrait inhiber l'activité enzymatique en occupant des sites actifs clés et en formant des complexes stables par liaison hydrogène et contacts hydrophobes. Le rôle des liaisons hydrogène dans la stabilisation des complexes ligand-enzyme est particulièrement significatif, car elles

améliorent l'affinité de liaison et la spécificité en ancrant le ligand au sein du site actif (**Rawas et al., 2025**).

De plus, ce diterpène naturel est largement connu pour son activité antibactérienne (Murugan et al., 2025). Des études précédentes ont montré que le phytol est particulièrement efficace contre *E. coli*. De plus, en comparaison avec les études de docking existantes, nos résultats sont en forte concordance avec ceux rapportés par **Abbas et al., (2025)**, dans lesquels le phytol a montré des affinités de liaison significatives envers l'enzyme cruciale de l'ADN gyrase d'*E. coli*.

Fait intéressant, le dihydroactinidiolide a montré une affinité de liaison notable envers la gyrase d'ADN d'*E.coli*, soulignant son potentiel pour l'inhibition de la croissance bactérienne. Ce composé a déjà été identifié comme un constituant de divers composés volatils végétaux rapportés pour posséder une activité antibactérienne (**Das et al., 2018** ; **Laungsuwon & Chulalaksananukul, 2014**). Cependant, ces résultats contrastent avec ceux de **Safdar et al., (2023)**, qui ont démontré que le dihydroactinidiolide ne montrait aucune affinité ou interaction mesurable avec la gyrase d'ADN d'*E.coli* (PDB : 6RKU). Cette divergence peut être attribuée à des différences dans les protocoles de docking, les conformations des protéines ou les méthodes de préparation des ligands utilisées dans chaque étude. Bien que le butylhydroxytoluène ait été rapporté comme possédant une activité antibactérienne légère. Les résultats de l'amarrage ont montré une activité prometteuse, soulignant son potentiel. Il y a un manque notable de recherches publiées examinant spécifiquement son potentiel inhibiteur contre la gyrase d'ADN bactérienne. Les résultats actuels de l'amarrage moléculaire fournissent donc de nouvelles perspectives, suggérant que le butylhydroxytoluène pourrait exercer ses effets antibactériens, au moins en partie, par interaction avec cette enzyme critique.

D'autre part, la carvone était très stable dans le site actif de la gyrase d'ADN de *S.aureus*. Ce composé a déjà été rapporté comme inhibiteur de la croissance bactérienne (**Bouyahya et al., 2021**). De plus, ce résultat s'aligne parfaitement avec l'étude de **Ghannay et al., (2022)**, qui ont rapporté une activité similaire de la carvone à travers des études de liaison de ligands contre la gyrase d'ADN (*S. aureus*), avec une affinité de liaison de (-5,3 Kcal/mol). De même, le thymol a démontré de fortes interactions avec

le site actif de la gyrase d'ADN de *S. aureus*, corroborant ainsi les résultats rapportés par **Firdous et al. (2023)**.

En résumé, cette étude de docking démontre le potentiel inhibiteur prometteur des principaux composés naturels de l'huile essentielle de *Peganum harmala* contre la gyrase d'ADN bactérienne. Les scores de liaison favorables du phytol, du dihydroactinidiolide, de la carvone et du thymol corrèlent bien avec leurs activités antibactériennes rapportées, suggérant que l'inhibition de la gyrase de l'ADN est un mécanisme clé sous-jacent à leurs effets. En interférant avec la réPLICATION et la transcription de l'ADN, ces composés peuvent contribuer à la suppression de la croissance bactérienne. Dans l'ensemble, ces résultats renforcent l'argument en faveur du développement de composés dérivés de plantes comme agents antibactériens alternatifs ciblant les enzymes bactériennes essentielles.

Pour l'activité antifongique, les composés carvone et phytol étaient particulièrement efficaces contre *Candida albicans*, avec des énergies de liaison de (-7.3) kcal/mol et (-7,8) kcal/mol respectivement. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'arrangement spécifique des groupes fonctionnels dans ces molécules, ce qui permet une interaction optimale avec les sites de liaison fongiques. Les groupes polaires et électrophiles dans des positions bien choisies facilitent la formation de multiples liaisons hydrogène et interactions électrostatiques, stabilisant ainsi les complexes ligand-protéine. En revanche, pour d'autre souche fongique *Aspergillus*, les énergies de liaison sont plus élevées, ce qui suggère que la configuration des substituants n'est pas optimale pour ces cibles spécifiques, entraînant une affinité plus faible.

La visualisation des résultats d'interaction est réalisée à l'aide du programme Discovery Studio. Cela nous permet d'observer les types d'interactions intermoléculaires, les distances entre chaque liaison, et quels groupes sont responsables de la formation des liaisons et de la stabilité du complexe ligand-protéine. Les liaisons hydrogène qui sont trouvées et indiquées par la couleur verte sont connues pour être responsables d'une grande partie de la stabilité du complexe. Dans notre cas, la **Figures 66**.

Montrent clairement que tous les complexes formés par nos molécules possèdent de nombreuses liaisons hydrogène, ce qui renforce la stabilité du complexe. Il existe d'autres interactions non covalentes en plus des liaisons hydrogène, telles que les liaisons électrostatiques, qui aident à maintenir la stabilité du complexe ligand-protéine. Ces interactions non covalentes rendent le complexe plus fort et plus efficace dans sa fonction. En combinant ces interactions, l'amarrage moléculaire a fourni une perspective globale sur le ligand-récepteur. Dans l'ensemble, la diversité des interactions non covalentes présentes dans nos complexes ligand-protéine met en évidence le réseau complexe de forces qui contribuent à leur stabilité et fonctionnalité.

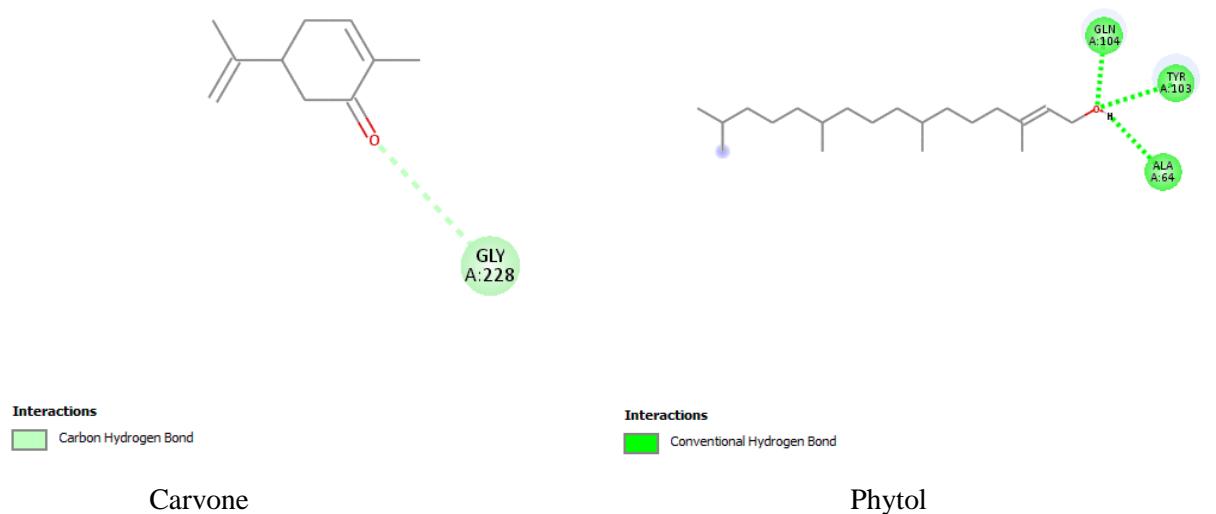


Figure 66. Interaction 2D carvone et phytol de l'huile essentielle de *Peganum harmala* contre *Candida albicans*.

Conclusion

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement surtout végétales afin de traiter et de soigner toutes sortes de maladies. Pour cela la découverte de ressources naturelles du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

L'Algérie par sa position géographique abrite une biodiversité exceptionnelle occupée par une importante richesse des Plantes Aromatiques et Médicinales.

Le travail présenté dans cette thèse a pour objectif d'exploiter des composants bioactifs d'origine naturelle à partir des feuilles de *Peganum harmala* de deux régions différents du sud Algérien.

Une évaluation organoleptique et physicochimique des deux huiles essentielles étudiés suivie par un dosage quantitatif et qualitatif des principes actifs de ces huiles essentielles et finalisant par une étude des activités antibactériennes.

Les analyses par la GC-MS ont montré la dominance des Carvone, Phytol, acide Carbamique, acide Laurique, Thymol et Tetrapentacontane dans huile essentielle de *Peganum harmala* de la région de Bougrib. En contrepartie les constituants majeurs du huile essentielle de *Peganum harmala* de la région de étaient : Phytol, Carvone, Tetrapentacontane, Phytone, Butylated-Hydroxytoluene.

Les résultats de l'étude antibactérienne obtenus par la méthode de diffusion sur milieu gélosé et les valeurs des CMI ont démontré que l'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle de *P.harmala* du sud de l'Algérie a été démontrée contre cinq bactéries et champignons. Cette essence a montré forte activité antimicrobienne contre toutes les souches testées.

En général, les bactéries Gram-positives et les champignons être plus sensible aux huiles essentielles que les bactéries Gram-négatifs. Cette grande puissance est attribuée principalement à leur haute teneur en terpènes oxygénés (Carvone, Phytol, Thymol et Dihydroactinidiolide) ces molécules principales responsables de ces effets antimicrobiens définie par technique docking moléculaire.

Cependant, l'activité antimicrobienne enregistrée confirme certaines des utilisations traditionnelles de la plante dans le traitement de certaines maladies.

En guise de remarque finale, il est également essentiel de mentionner que le l'huile essentielle de *Peganum harmala* est un domaine où beaucoup reste à étudier pour exploiter ses propriétés.

Nous espérons que ces études vont être achevées pour bien cibler les molécules principales responsables de ces effets antimicrobiens, ce qui fait appel à des techniques de purification et d'identification via l'étude photochimique et les analyses spectrales.

La relation intime qui lie la structure chimique et l'activité des huiles essentielles de la *Peganum harmala* constitue le fondement de l'aromathérapie scientifique et doit être étudiée dans d'autres travaux. Tel que l'application pratique dans l'industrie alimentaire pour réduire les impacts indésirables sur propriétés sensorielles et de prolonger la durée de conservation de l'aliment.

*Références
bibliographiques*

Adam M., Berset C., Kessler M., Hamburger M., 2009. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders- A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *J. Ethnopharmacol* 121(3): 343-359.

Adam R.P., 2001. Identification of essential oils by Capillary Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL.

Adams R.P., 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Illinois.

AFNOR, 2000. Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6^{ème} édition. AFNOR, Paris.

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS): Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. 2008.

Akbli, M., Rhallabi, N., Mhand, R. A., Akssira, M., & Mellouki, F. (2016). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sciure du bois de loupe de *Tetraclinis articulata* (Vahl) master du Maroc sur des souches d'origine clinique [Antibacterial activity of the essential oil of sawdust of root burl wood of *Tetraclinis articulata* (VAHL) master of Morocco against clinical strains]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 16(2), 314.

Altmeyer, M., Amtmann, E., Heyl, C., Marschner, A., Scheidig, A. J., & Klein, C. D. (2014). Beta-aminoketones as prodrugs for selective irreversible inhibitors of type-1 methionine aminopeptidases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(22), 5310-5314.

Andrianne P. La gemmothérapie: passé, présent et avenir. *Phytothérapie*. 2008;6(1):29-32.

Anses. 2010. Évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition par ingestion de Pseudomo-nades dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées).

Anses. 2016 a. Danger biologique transmissible par les aliments : *Bacillus cereus*.

Anses. 2016 b. *Staphylococcus aureus et entérotoxines staphylococciques*.

Anses. 2019. *Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC)*.

ANSM : Agence National de Sécurité du médicament et des produits de santé « http://www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/657257784ff10b16654e1ac94b60e3fb.pdf »

Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010. *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America. 994p.

Bhalodia NR, Shukla V. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* l. An ethnomedicinal plant. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2011;2(2):104.

Boti J.B., Muselli A., Tomi F., Kouakou G., N'guessan Y.T. Costa J. & Casanova. 2006. - Combined analysis of *cymbopogon giganteus* Chiov. Leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and 13-NMR. *Compte rendu de Chimie*. 99 : 164-168.

Boukhatem MN, Ferhat A et Kameli A: Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : revue de littérature. *Revue Agrobiologia* 2019, 9:1653-1659.

Bouzid, DJIHANE, Nouioua ,WAFA, Soltani, ELKHAMSSA, et al. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017, vol. 25, no 5, p. 780-787.

Bruneton J., 1987. *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie*, Ed. Tec, Lavoisier

Bruneton J., 1993. *Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales*. Edition. Technique et documentaire, 3eme édition.

Bruneton, J., *Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales*, 1999, 3.Ed. Tec & Doc, Paris.

Burt S., 2004.- Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food and Microbiology*. 94: 223-253.

C. Abad-Zapatero, Notes of a protein crystallographer: on the high-resolution structure of the PDB growth rate, *Acta Crystallogr. Sect. -Biol. Crystallogr.* 68 (2012) 613–617, <https://doi.org/10.1107/S0907444912004799>.

C. Yung-Chi, W.H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol.* 22 (1973) 3099–3108, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2).

Chami F., 2005. Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo* application dans la prophylaxie et le traitement de la *Candidose Vaginale* sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. *Thèse de doctorat*, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266p.

Clarke S., 2008. Chemistry of essential oil. 1st edition *ELSEVIER*. British, 302p.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), (2006). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 9ème Ed. M2-A9, Wayne, Pennsylvanie, Etats-Unis: Clinical and Laboratory Standards Institute. 26(1).

De Smet PA. Herbal remedies. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(25):2046-2056.

Définition présente dans l'introduction des recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles (mai 2008) de l'Afssaps

Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., 2008. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87p.

Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. & Mazza G. 2002.- Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74:101-109.

Dey YN, Ota S, Srikanth N, Jamal M, Wanjari M. A phytopharmacological review on an important medicinal plant-*Amorphophallus paeoniifolius*. *Ayu*. 2012;33(1):27.

Djarri L (2011). Contribution à l'étude des huiles essentielles et des métabolites secondaires de trois plantes Algériennes de la famille des Apiaceae, *Daucus reboudii Coss. Ex Batt. Trab.*, *Kundmannia sicula (L.) DC.*, et *Elaeoselinum thapsioides Maire*. Thèse de doctorat en chimie organique, Université Mentouri, Constantine, 267 p.

Djibo A., Bouzou S. B., 2000. Acute intoxication with "sobi lobi"(Datura). Four cases in Niger *Bulletin of Society Pathological and Exotical*; 93(4):294-7.

Dugo G. et DI Giacomo A., 2002. Citrus. The genus Citrus. Taylor & Francis Publishing, London. 638 p.

F.E. Kalai, E.B. Çınar, C.-H. Lai, S. Daoui, T. Chelfi, M. Allali, N. Dege, K. Karrouchi, N. Benchat, Synthesis, spectroscopy, crystal structure, TGA/DTA study, DFT and molecular docking investigations of (E)-4-(4-methylbenzyl)-6-styrylpyridazin. -3 (2H)-one, J. Mol. Struct. 1228 (2021) 129435, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129435>.

Farhat A: Vapo-diffusion assistée par micro-ondes : conception, optimisation et application. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) & Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (Tunisie), 2010.

Ferreira, L. G., dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20(7), 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>

Figueredo G: Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de doctorat, Université de Blaise Pascal, France, 2007.

Fouché J.G., A. Marquet, A. Hambuckers., 2008. Les plantes médicinales de la plante au médicament Conception et réalisation.

FranceAgriMer: Marché des plantes à parfum, aromatiques et médicinales. In Panorama 2020-2021.

FranceAgriMer: Production et marchés des huiles essentielles. AROMADAYS 2019-2020.

Garnéro J., 1996. Huiles essentielles. *Techniques de l'Ingénieur*, traité Constantes physicochimiques ; K 345-1, 39p.

Garnero J., 1996. Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur K345 pp 1-45.

Garreta R. Des simples à l'essentiel: de l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales. Presses Univ. du Mirail; 2007.

Gazengel J-M., Orecchioni A-M. Le préparateur en pharmacie. 2ème édition. Ed.Lavoisier, Paris, 2013

Gonny M., Bradesi P. & Casanova J., 2004.- Identification of the components of the essential oil from Corsican *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour and Fragrance Journal*. 19: 424-433.

Guba R., 2001. Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *Int. J. Aromather.* 11: 76-83.

H.-C. Wang, K.-C. Hsu, J.-M. Yang, M.-L. Wu, T.-P. Ko, S.-R. Lin, A.H.-J. Wang, *Staphylococcus aureus* protein SAUGI acts as a uracil-DNA glycosylase inhibitor, *Nucleic Acids Res* 42 (2014) 1354–1364, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt964>.

Hart, T., & Shears, P. (1997). *Atlas de Poche de Microbiologie*, Flammarion Médecine-Sciences, 1997: *Atlas de Poche de Microbiologie* (Vol. 1). Bukupedia.

Hatanaka A, Kajiwara T, Sekiya J (1987). Chem. Phys. Lipids, Biosynthesis pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves, (44), 1987, 341-361.

Herman Alex W., Cochrane N. A. and Sameoto D. D., 1993. Detection and Abundance Estimation of Euphausiids Using an Optical Plankton Counter. *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 94, 165-173.

Hmamouchi M. Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. Editions Fedala, Mohammedia 1999

Hussain, AI., F. Anwar, S. Ali, S. Chatha, A. Jabbar, 2010. Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology 4(4): online [<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000400027>].

Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A. 2001. Larousse des plantes medicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.

ISO, 1997.

K.E. Murphy-Benenato, B. Dangel, H.E. Davis, T.F. Durand-Réville, A.D. Ferguson, N. Gao, H. Jahić, J.P. Mueller, E.L. Manyak, O. Quiroga, M. Rooney, L. Sha, M. Sylvester, F. Wu, M. Zambrowski, S.X. Zhao, SAR and Structural Analysis of Siderophore-Conjugated Monocarbam Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* PBP3, ACS Med. Chem. Lett. 6 (2015) 537–542, <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00026>.

Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(11), 935–949. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>

König W.A., Hochmuth D.H., Joulain D., 2001. Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils., Library of Mass Finder 2.1, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany.

Koubaa M, Mhemdi H, Barba F J, Roohinejad S, Greiner R, Vorobiev E. 2016. Oil seed treatment by ultrasounds and microwaves to improve oil yield and quality: An overview. Food Research International, 85: 59-66.

Lardry J-M, Haberkorn V. L‘aromathérapie et les huiles essentielles. Kinésithérapie, la revue. 2007;7(61):14-17.

Life sciences and material sciences. dassault systemes BIOVIA. (n.d.). URL <https://www.3ds.com/products-services/biovia/>. (accessed June 6, 2022).

Loupy A (2006). Microwaves in Organic Synthesis, 2ieme édition, Tome I et II. Wiley- VCH, Weinheim.

M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, Gaussian 09, Revision B. 01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009. Search PubMed;(b) NM O'Boyle, AL Tenderholt and KM Langner, J Comput Chem 29 (2008) 839.

Mady Pirard. 2016. Initiation à la phytothérapie. Edition : Edilivre-aparis.

Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>

Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). *Molecular docking*. In Kukol, A. (Ed.), Molecular Modeling of Proteins (pp. 365–382). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19

NF ISO 1242. (1999). Huiles essentielles – Détermination de l'indice d'acide. (Indice de classement: T75-103).

NF ISO 279. (1999). Huiles essentielles – Détermination de la densité relative à 20 degrés Celsius. (Indice de classement: T75-111).

NF ISO 280. (1999). Huiles essentielles – Détermination de l'indice de réfraction. (Indice de classement: T75-112).

NF ISO 592. (1999). Huiles essentielles – Détermination du pouvoir rotatoire. Essential oils. (Indice de classement: T75-113).

NF ISO 709. (2002). Huiles essentielles – Détermination de l'indice d'ester. (Indice de classement: T75-104).

NF ISO 875. (1999). Huiles essentielles – Évaluation de la miscibilité à l'éthanol. (Indice de classement: T75-101).

NF T 75-102. (1969). Huiles essentielles – Détermination du point de congélation. Essential oils. Determination of freezing point. (Indice de classement: T75-102) NF V05-113. (1972). Détermination du taux de cendres. Norme française.

NFT 03 903. (1966). Détermination de la teneur en eau. Norme française.

Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., Hajlaoui, H., Ksouri, R., Valentin, E., Bakhrouf, A. (2011). Antibacterial, anticandidal and antioxidant activities of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(17): 4138-4146.

Ntezurubanza L. I., Scheffer J. J. C., Looman A. and Baerhiem Svends, 1984. Composition of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum* grown in Rwanda. *Planta Medica.*, 385-388.

O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 455–461, <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

Ouamba J.M., 1991. Valorisation chimique des plantes aromatiques du Congo. Extraction et analyse des huiles essentielles Oximation des aldéhydes naturels. *Mémoire de magister*. Université Montpellier II, 342p.

Oussalah M., S. Caillet and M. LACROIX. *Mechanism of Action of Spanish oregano, Chinese cinnamon and savory essential oils on Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes*. *Journal of food Protection*. 69 (5), 1046-1055, 2006. BURT S., *essential oils : a review*. *International Journal of Food Microbiology*. 94, 223- 253, 2004.

Oussalah M., S. Caillet, L. Saucier and M. LACROIX. *Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth: E. coli O157:H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18 (5), 414-420, 2007.

Oussalah M., S. Caillet, L. Saucier and M. LACROIX. *Inhibitory effects of selected plant essential oils on Pseudomonas putida growth, a bacterial spoilage meat*. *Meat Science*. 73, 236-244, 2006.

Oussalah M., S. Caillet, S. SalmiéRl, L. Saucier and M. LACROIX. *Antimicrobial effects of alginate based film containing essential oils for preservation of whole beef muscle*. *Journal of food Protection*. 69 (10), 2364-2369, 2006.

Oussou K.R., 2009. –Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l’Université de Cocody-Abidjan, 241p.

Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszyński, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, 9, 91–102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>

Paris R., Moyse H., 1969. Précis de matière médicinale. Paris: Masson.

PDB-5hsg, Crystal structure of an ABC transporter Solute Binding Protein fr... - Yorodumi, (2016). <https://pdbj.org/emnavi/quick.php?id=pdb-5hsg>(accessed June 13, 2023).

Perfumer & Flavorist, 2009. A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries, Vol. 34. *In* Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America. 994p.

Pharmacologie Européenne: Direction de la Qualité du Médicament et Soins de Santé du Conseil de l’Europe (DEQM). Strasbourg, France; 2007.

Pharmacopée Farnçaise, 1985. t.1, Vol. 4, 5, 8, Maisonneuve, Paris.

Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A, (2003). Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1164

R.P.D. Bank, RCSB PDB: homepage, (n.d.). <https://www.rcsb.org/>(accessed June 21, 2022)

Rhayour K., 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. *Thèse de doctorat*. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 170p.

Richard Nicol.2016. manuel de microbiologie appliquée à l'usage des techniciens de l'agroalimentaire et des laboratoires. LEXITIS EDITION. ISBN : 978-2-36233-163_3

S. Kane, Subset of non-redundant, high resolution multi-pass membrane protein PDB structure files from OPM, (2023), doi:10.5281/zenodo.8006195

Salvador, D. (2018). Étude structurale d'un système d'efflux tripartite bactérien MexAB-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa* . thèse de doctorat . Université de Bordeaux.

Sankaran R. L'esprit de l'homéopathie. 2000.

Sanogo, Y., Guessennd, N.K., Tra Bi, H.F., Kouadio, N.J., Konan, F.K., Bamba, M., Danho, N., Bakayoko, A., Yao, K., Dosso, M. (2016). Evaluation in vitro de l'activité des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. et Perr. (Combretaceae) sur des bactéries responsables de maladies courantes en Afrique et criblage phytochimique. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 10(3): 1139-1152.

Seguin E., 2001. Le préparateur en pharmacie « Botanique - Pharmacognosie - Phytothérapie - Homéopathie ». Ed. O.P.U, Alger. 208 p.

Sell, C.S (2006). The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer. 2 nd edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p.

Six, S. C., Buyser, M., Vignaud, M., Dao, T. T., Messio, S., & Payraud, S. (2012). Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bull. Épidémiol. Anim. Aliment.*, 50, 57-61.

Strang C. 2006. Larousse medical. Ed Larousse

Svoboda K.P, Greenaway R.I (2003). Int. Jour. Arom., Investigation of volatile oil gland of *Satureja hortensis L.* (Summer savory) and phytochemical comparison of different varieties, (13), 2003, 196-202.

Teisseire P. J., 1991. *Chimie des substances odorantes*, Ed Lavoisier, Paris.

Tortora J., Funk B.F., Case CH.L, (2003). Introduction à la microbiologie, (edn) ISBN. Canada.

Worthy, H. L., Williamson, L. J., Auhim, H. S., Leppla, S. H., Sastalla, I., Jones, D. D., ... & Berry, C. (2021). The crystal structure of *Bacillus cereus* HblL1. *Toxins*, 13(4), 253.

Annexes

Original Research

Phytochemical composition and antimicrobial activity of essential oil and extracts from the leaves of *Peganum harmala* L. in southern Algeria.

Ghillace Abderrahmane ^{1*}, Chouitah Ourida ¹, Kiari Fatima Zohra ¹, Fergoug Zineb ², Daikh Zineeddine ²

Abstract

Medicinal plants have a wide use in traditional medicine. The aim of our study is to valorize medicinal and aromatic plants of the Algerian flora. For this reason, we determined the phytochemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peganum harmala* in two different southern regions. Phytochemical screening reveals the presence of flavonoids, alkaloids, saponins, tannins, glycosides, terpenoids and steroids and the absence of anthraquinonesin extracts. The essential oil of *P. harmala* leaves collected from two different regions (Bougtob and Mechria)was analyzed by GC-MS. The results revealed the presence of 55 and 47 compounds with a yield of 0.217 % and 0.211 %. These essential oils do not contain the same major components for Bougtob region: Carvone 21.15%, Phytol 17.41%, Carbamic acid 3.52%, Lauric acid 2.10%, Thymol 1.77% and Tetrapentacontane 1.32%. For the region of Mechria, Phytol 10.24%, Carvone 5.92%, Tetrapentacontane 2.80%, Phytone 2.18%, Butylated Hydroxytoluene 1.48%, Lauric acid 1.39%. The essential oils which were tested showed variable degrees of antimicrobial activity. In general, Gram-positive bacteria and fungi were found to be more sensitive to the essential oils than Gram-negative bacteria.

Keywords

Peganum harmala, Leaves, Essential oil and extracts,GC-MS, Phytochemical screening, Antimicrobial activity, southern Algeria.

1 Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering and HealthSafety, Faculty SNV, University of Mustapha Stambouli - Mascara, Algeria

2 Laboratory of Physical and Chemistry of Macromolecules and Biological Interface University of Mustapha Stambouli - Mascara, Algeria

* Corresponding author:

E-mail address:
abderrahmane.ghillace@univ-mascara.dz

Citation: Abderrahmane, G., Ourida, C., Zohra, K. F., Zineb, F., Zineeddine D., (2025). Phytochemical composition and antimicrobial activity of essential oil and extracts from the leaves of *Peganum harmala* L. in southern Algeria. *Acta Biologica Slovenica* 68 (1)

Received: 26.11.2024 / **Accepted:** 07.01.2025 /
Published: 09.01.2025

<https://doi.org/10.14720/abs.68.01.21296>

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY SA) license

Fitokemična sestava in protimikrobnna aktivnost eteričnega olja in izvlečkov iz listov *Peganum harmala* L. v južni Alžiriji.

Izvleček

Zdravilne rastline imajo široko uporabo v tradicionalni medicini. Namen naše raziskave je valorizirati zdravilne in aromatične rastline alžirske flore, zato smo določili fitokemično sestavo in protimikrobnno delovanje eteričnega olja *Peganum harmala* v dveh različnih južnih regijah. Fitokemijski pregled razkrije prisotnost flavonoidov, alkaloidov, saponinov, taninov, glikozidov, terpenoidov in steroidov ter odsotnost antrakinonov v izvlečkih. Eterično olje listov *Pharmala*, zbranih iz dveh različnih regij (Bougrib in Mechria), je bilo analizirano z GC-MS. Rezultati so pokazali prisotnost 55 in 47 spojin z izkoristkom 0,217 % in 0,211 %. Ta eterična olja ne vsebujejo istih glavnih sestavin za regijo Bougrib Carvone (21,15 %), fitol (17,41 %), karbamsko kislino (3,52 %), lavrinsko kislino (2,10 %), timol (1,77 %) in tetrapentakontan (1,32 %). Za regijo Mechria, fitol (10,24 %), karvon (5,92 %), tetrapentakontan (2,80 %), fiton (2,18 %), butil hidroksitoluen (1,48 %), lavrinska kislina (1,39 %). Eterična olja, ki so bila testirana, so pokazala različne stopnje protimikrobnega delovanja. Na splošno je bilo ugotovljeno, da so po Gramu pozitivne bakterije in glive bolj občutljive na eterična olja kot po Gramu negativne bakterije.

Ključne besede

Peganum harmala, listi, eterično olje in izvlečki, GC-MS, fitokemični pregled, protimikrobnna aktivnost, južna Alžirija.

Introduction

Since the highest antiquity, Men have used plants found in nature in several fields, such as perfumery, pharmacology, agri-food, and disease treatments. (Roosta et al., 2017)

More than 20,000 aromatic and medicinal plants are used in traditional medicine (Pandey et al., 2013). These plants continue to provide valuable therapeutic agents for both modern and traditional medicine (Bouzouita et al., 2008).

Aromatic plants are characterized by the biosynthesis of odorous molecules, which constitute the essential oils known for their antiseptic and therapeutic activity in popular medicine for a long time (Samarth et al., 2017). Essential oils are complex natural substances with well-defined physicochemical characteristics and meet quality criteria that must be known to avoid any risk of toxicity, which may prove dangerous to health because some essential oils and medicinal plants are very dangerous (Haddouchi et al., 2008) in except to those of some medicinal plants. In addition, these products have a great variability in their chemical constituents, giving them many medicinal and biological properties that should be known and valued (Rashid et al., 2010).

The great use of antibiotics in medicine to fight pathogenic micro-organisms is not completely harmless to the body and can cause many undesirable effects (Rudramurthy et al., 2016). It clearly drives the evolution of resistance (CDCPOIDA, 2013). Epidemiological studies have demonstrated a direct relationship between antibiotic consumption and the emergence and dissemination of resistant bacteria strains. In bacteria, genes can be inherited from relatives or can be acquired from nonrelatives on mobile genetic elements such as plasmids. This horizontal gene transfer (HGT) can allow antibiotic resistance to be transferred among different species of bacteria. Resistance can also occur spontaneously through mutation. Antibiotics remove drug-sensitive competitors, leaving resistant bacteria behind to reproduce as a result of natural selection (Read et al., 2014). Despite warnings regarding overuse, antibiotics are overprescribed worldwide (The Antibiotic Alarm, 2013). Therefore, it is necessary to search for new natural antimicrobial molecules to inhibit various pathogenic microorganisms (Rudramurthy et al., 2016).

Algeria, by its geographical location, offers rich and diverse vegetation. A large number of aromatic plants grow there spontaneously. Interest in these plants has continued to grow in recent years. The Algerian flora includes 3300

species (Quzel & Santa, 1963). *Peganum harmala* L., commonly known as Syrian rue or Peganum, is a herbaceous plant belonging to the Zygophyllaceae family. The primary origin of *Peganum harmala* is central Asia, but nowadays, it grows in Australia, north of Africa and southwest of America (Bahmani et al., 2012). It is an herbaceous plant, glabrous, 30 to 60 cm in height with a lignified base, much branched with a winged stem at the top and alternate leaves. It possesses narrow leaves arranged alternately on fleshy, bright green stiff stems (Zargari et al., 1992). The flowers of the plant are isolated in the axils of the leaves, 1-2 cm, whitish-green in colour and round seed capsules containing more than 50 seeds. It has a strong, unpleasant odour (Zargari et al., 1992; Marwat et al., 2011).

Many related works show that *Peganum harmala* essential oils have antibacterial, antiviral, antioxidant, anti-parasitic and anticancer activities, among other biological activities. The purpose of our research is to evaluate the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils extracted from the leaves of *Peganum harmala*. This study aims to valorize medicinal and aromatic plants of the Algerian flora in order to find new bioactive natural products by the evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils which are extracted

from the leaves of *P. harmala* collected from two different regions (Bougtob and Mechria).

Materials and Methods

Plant material

The leaves of *P. harmala* (Figure 1) were collected in April 2020 from the Bougtob region (ElBayed-Algeria) and Mechria region (Naama-Algeria), situated in the South of Algeria. The plant was identified by a botanist from the Faculty of Science and Life at the University of Mascara. The leaves were cleaned, shaded, dried, and conserved in a closed and dark room.

Essential oil extraction

For the extraction of essential oils by hydrodistillation, Cleverger-type was used (Chouitah et al., 2017), and the dried plant 50g was submitted in a balloon of 500 ml for 3 hours. Sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) (used to dry the extract) was added to the essential oil that was recovered and stored in the refrigerator at 4°C and in the dark until use.

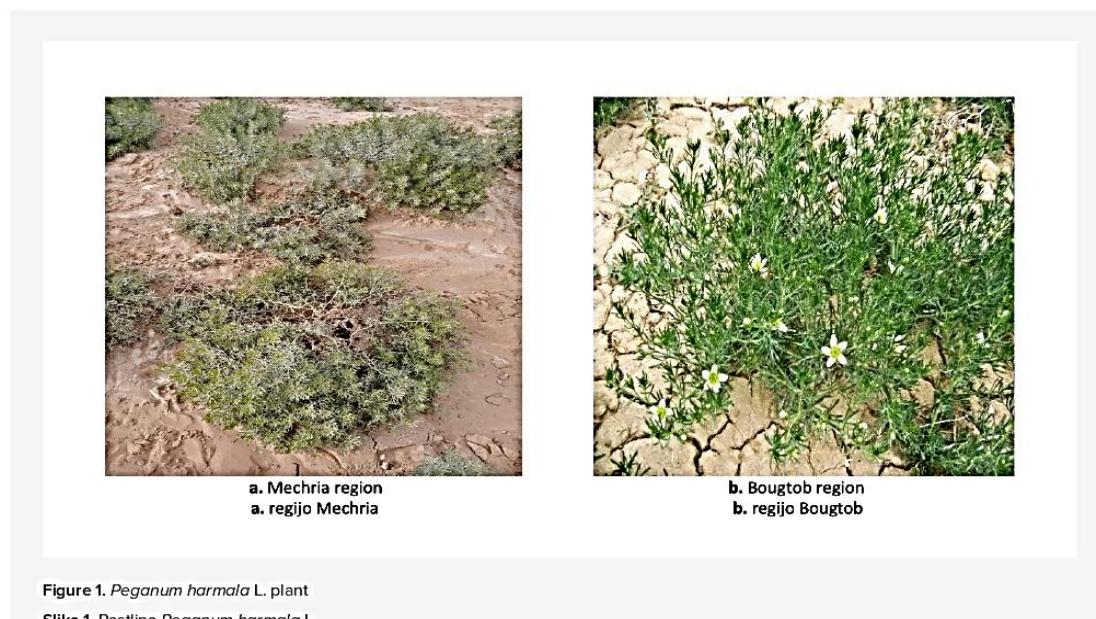


Figure 1. *Peganum harmala* L. plant

Slika 1. Rastlina *Peganum harmala* L.

The yield of essential oil was determined by its contribution to the dry material.

$$R (\%) = (m / m_0) \times 100$$

Where m : essential oil mass (g), m_0 : fresh leaves mass (g), R : essential oil yield (%) (Boutekedjiret et al., 2003).

Preparation of extracts

Ten grams of each powder sample (leaves) were quenched separately in 100 ml of hydromethanolic solution (water/methanol 20:80 v/v) for 48 hours with stirring to obtain two extracts (Mechria and Bougib region hydromethanolic extracts). The extracts were then filtered using a Whatman No. 1 filter paper. All filtrates were pressured to a boiling temperature of 50 °C, then they dried at 40 °C and stored at 4 °C until their analysis (Pharmacognosie, 1999).

Analysis of the essential oils

According to AFNOR NF ISO 280: 1999, essential oils must respond to analytical characteristics that are established by international committees of experts. Standard organoleptic tests and measuring of some physicochemical parameters were performed.

Organoleptic characters

It is a very important test in determining the quality of an essential oil. It is based on the colour, smell and appearance of the essential oil and is carried out according to AFNOR NF ISO 280 (1999).

Physical properties of the essential oil

Essential oil is said to be miscible with V volume and more ethanol of alkalimetric strength determined at a temperature of 20°C (AFNOR 75-101, 2000). When the mixture of 1 volume of the essential oil with V volumes of this ethanol is clear, and the remainder after gradual addition of ethanol of the same strength up to a total of 20 volumes.

Briefly, ethanol of suitable alcoholic strength is gradually added to a test portion of essential oil at a temperature of 20°C, and then their miscibility was evaluated by stirring vigorously during the addition of the solvent. When the obtained solution was perfectly clear, note that the volume (V) of dilution of ethanol was used with continuous addition of solvent in 0.5ml portions up to a total of 20ml, and stirring was performed after each addition. The miscibility of essential oils with ethanol of title t , at a temperature of 20°C, is expressed by One volume of essential oils in V volumes of ethanol with title t .

The acid index (NFT 75 103, 1982) expresses the number of milligrams of potassium hydroxide (KOH) required to neutralize the free acids contained in one gram of essential oil. 2 g of essential oil was added to 5 ml of ethanol 95% and five drops of phenolphthalein at 0.2%. The solution was neutralized by the solution of KOH (0.1 mol / l) until a pink colour. We denoted the volume of the KOH solution added. The calculation of AI is given by the formula: $AI = 5.61 \times V / M$; 5.61: Corresponds to 0.1 mol / L KOH; M : mass in grams of the essential oil; V : Volume in millilitres of ethanol solution of KOH (0.1 mol / l) used for titration.

The ester index value(NFT 75 104, 1982) is the number of milligrams of KOH needed to neutralize the free acids by hydrolysis of esters contained in one gram of essential oil. 2 g of essential oil was added to 25ml of ethanol solution of KOH (0.5 mol / l). It adopted the condenser, placed the ball on the heating mantle and allowed it to heat for one hour. Then, the solution was added to 20 ml of distilled water and five drops of 0.2% PP. The excess KOH solution was titrated with hydrochloric acid 0.5 mol / l. A blank test was carried out under the same conditions and with the same reagents. The calculation of EI is given by the formula: $EI = (28.05 \times (V_0 - V_1) / M) \times IA$; 28.05 g / l: corresponding to 0.5 mol / L KOH; M : mass in grams of the test; V_0 : Volume in ml of the HCl solution (0.5 mol / l) used for the blank; V_1 : volume in ml of the HCl solution (0.5 mol / l) used to determine the EI of the EO.

Physical properties of the essential oil

Relative density was performed using a pycnometer with a volume of 1 ml and temperature of 20 °C(NF T 75 111, 1982). Rotator power was obtained according to NF T 75 113 (1982)using a polarimeter-type VISTA C25. Light source (sodium-vapour lamp) for obtaining a light wavelength of 589.3 nm ± 0.3 and a viewing tube 100 ± 0.5 mm in length. The refractive index was carried out using a refract meter to Bellingham type with a precision of ± 0.0002, a direct reading of refractive index between 1.3000 and 1.7000 situated(NF T 75 112, 1977).The freezing point was determined according to AFNOR 75-111 (2000). The essential oil was put in test tubes inside a freezer, accompanied

by a thermometer, hence the observation of temperature variations accompanying the solidification of the oil, which was cooled slowly and gradually.

Phytochemical screening

Phytochemical analysis of plant extracts is necessary to reveal the presence of certain chemical families. The detection of different phytochemical components of *P.harmala* extracts was performed by chemical detection tests based on phenomena of precipitation or colouration using the methods described in the literature. To test for phenols, we added to 2 ml of each extract solution a drop of 2 % FeCl_3 alcoholic solution. The positive reaction was expressed by the appearance of a green or blue-black colouration (Adou et al., 2016). For the test of flavonoids, we added 0.5 ml of each extract, ten drops of concentrated hydrochloric acid and a few milligrams of sunflower magnesium. Positive results were indicated by a pink-red or yellow colouration after three minutes of incubation (Haddouchi et al., 2016). To test for tannins, we took 3 ml of extract, placed it in a test tube and diluted with chloroform. 1 ml of acetic anhydride was added. Then, 1 ml of sulphuric acid was poured in carefully. A green colour was obtained, indicating the presence of tannins (Hossain et al., 2013). For the test for saponins, the dry powder was vigorously mixed with water. A positive result was indicated by the appearance of foam for more than 5 minutes (Joshi et al., 2013). For the test for coumarin glycosides, a few drops of FeCl_3 alcoholic solution were added to each extract. The presence of coumarins is indicated by the appearance of a green colouration after the addition of concentrated HNO_3 (Joshi et al., 2013). For the test for anthraquinones, approximately 0.5 g of the extract was stirred with 5 ml chloroform for ten minutes and filtered. The filtrate was shaken with 5 ml of ammonia solution. The presence of pink colour in the ammonia phase indicates the presence of anthraquinones. For a combined anthraquinones test, 1 g of powdered extract boiled with 5 ml of 10 % hydrochloric acid for five minutes. The cold filtrate was diluted with chloroform. The chloroform layer was then transferred to a test tube. An equal volume of 10 % ammonia was added to the chloroform extract. The presence of combined anthraquinones was indicated by a pink, red, or purple colour (Abodunrin et al., 2015). For the test for alkaloids, 0.5 g of the extract was mixed with 5 ml of 1 % aqueous hydrochloric acid in a water bath. A few drops of Dragendorff's reagent were added to 1 ml of the filtrate.

Turbidity or precipitation was considered to have a positive result (Ismail et al., 2016). For the test for steroids, 2 ml acetic anhydride and 2 ml H_2SO_4 were added to 5 ml of the extract. The colour change from violet to blue confirmed the presence of steroids (Kumar, 2015). For the test for proteins, 2 ml of NaOH (4 %) and a few drops of 3 % CuSO_4 solution were mixed with 2 ml of solution extract. The presence of protein is indicated by the formation of purple or pink colour (Maria et al., 2018). For the test of quinones, 3 ml of each extract was treated with 3 ml of chloroform, and then the chloroform layer was separated. A volume of potassium hydroxide (5 %) was then added to the chloroform layer. The appearance of red colour indicates the presence of quinones (Amezouar et al., 2013).

Chromatographic analysis: Gas chromatography/mass spectrometry analysis (GC-MS)

The volatile constituents of the essential oil were analyzed by "Shimadzu" GCMS-TQ8030 Gas chromatograph mass spectrometer with a Stabilwax silica capillary column (30 m \times 0.32 mm, film thickness, 0.25 μm). Maximum Temp 350°C. The carrier gas was helium, Column Oven Temperature: 50°C, Injection Temperature: 220°C, rate change of 5°C/min, Equilibrium Time: 3min, vial capacity: 1.5 ml, and syringe capacity: 10 μl .

Microbial strains

The antimicrobial activity of the essential oil samples was tested against seven different microorganisms: The strains of the international ATCC collection (American Type Culture Collection).

Gram+: *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus cereus* ATCC 11778.

Gram-: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Fungus: *Candida albicans* ATCC 30031, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Suspensions were adjusted to 1×10^7 CFU/ml (equivalent to 0.5 Mc Farland). These strains were maintained on slants of Nutrient Agar for bacteria and Sabouraud Agar for the fungus at 4°C. The tested microbial strains were provided by the Pasteur Institute (Algiers, Algeria).

Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of essential oils from *P. harmala* leaves was evaluated using the paper disk diffusion method (Davis et al., 1994). Petri dishes (90 mm in diameter) were prepared with 20 ml of sterile Mueller-Hinton agar and dimethyl sulfoxide (DMSO) solution for bacteria and Sabouraud agar for fungi. Agar plates were stored at 4°C before use (Fauchère et al., 2002).

The antimicrobial activity test

Saturated with essential oil, the impregnated discs (with 3 µl of essential oil at a final concentration of 1-20 µg/ml) were then placed on the surface of the agar (Dean et al., 1987). The bacteria were spread over the discs, the spreading of the tested product over the entire disc determined the degree of concentration, the micro-organisms grew over the entire surface of the agar except where they encountered a sufficient concentration of the product, which would inhibit their growth after incubation 24h at 37°C (bacteria) and 48h at 25°C (fungi) around of the discs, we observed a clear circular zone formation. This is the zone of inhibition. In addition, this zone of diameter is large; the sensitivity of antibiotics induces more resistance to the bacterium. The diameter of the growth inhibition zone was measured with a calliper and expressed in mm (including the diameter of the 6 mm disc). (Billerbeck et al., 2002; NIST, 2002)

The minimum inhibition concentrations (MICs)

Were performed according to the Muller-Hinton broth microdilution method in 96 multiwall microtiter plates (Marino et al., 2001). The essential oils were dissolved in aqueous DMSO, and the initial concentration was 25 µg/ml. (Smânia et al., 1995). The initial concentration was serial dilution, which is a two-fold serial dilution. Each well contained 10⁷ CFU/ml of bacteria. After incubation for 24h at 37°C (bacteria) and 48h at 25°C (fungi), the CIM was determined as the lowest concentration at which no visible microorganism growth had occurred. All tests were performed in triplicate (Gilles et al., 2010).

Results and Discussion

The physicochemical analysis of the leaf extracts of *P. harmala* demonstrated the following results: an oily appearance, a yellowish colour, and a strong, unpleasant odour. The yield of essential oil obtained by hydro-distillation of dry plants was 0.217 ± 0.03% for the *P. harmala* Bougtof region and 0.211 ± 0.05% for the Mechria region sample. In a study by Ida et al. in the Bousaada region (South of Algeria), hydrodistillation yielded 0.005% (Ida et al., 2016).

The variations found in the yield of essential oil view of our samples compared to some previous studies may be due to some environmental factors (such as soil composi-

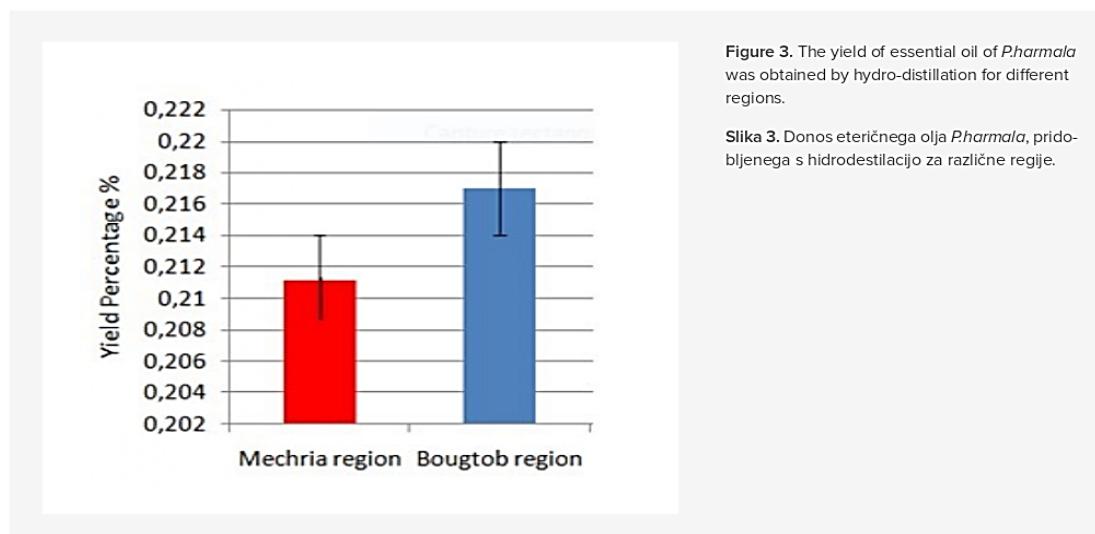


Figure 3. The yield of essential oil of *Pharmala* was obtained by hydro-distillation for different regions.

Slika 3. Donos eteričnega olja *Pharmala*, pridobljenega s hidrodestilacijo za različne regije.

tion, geographical location and climate conditions), the part of the plant used, the age of the plant and the period of the growing season or even to genetic factors (Hussain et al., 2009; Anwar et al., 2009).

Phytochemical screening

Phytochemical screening in the leaves of *P. harmala* showed the presence of flavonoids, alkaloids, saponins, tannins, glycosides, terpenoids and steroids and the absence of anthraquinones for two regions.

Phytochemical Compounds of Essential Oil

The chromatographic analysis of the essential oil of *P. harmala* from the Bougntob region revealed the presence of 55 volatile, constituting 66.59% of the total essential oil recovered from dry material (Table 4, 5). The chemical analysis showed that the characterized essential oil possessed many potentially bioactive substances, which were identified, and the following compounds are representing the major constituents: (1) Carvone 21.15%, (2) Phytol 17.41%, (3) Carbamic acid 3.52%, (4) Lauric acid 2.10%, (5) Thymol

Table 1. Physicochemical composition of *Peganum harmala*.

Tabela 1. Fizikalno-kemijska sestava *Peganum harmala*.

Specification	<i>Peganum harmala</i> (M)	<i>Peganum harmala</i> (B)
Density	0.905	0.907
Rotating power	+2°	+ 2°
Refractive index	+1.4693	+ 1.4695
Freezing point	-18	-18
Solubility in ethanol 90%	1:3	1:3
pH	6.02	6.06
Acid index	0.517	0.521
Ester index	22.7	23.2

(M): Mechria region, (B): Bougntob region.

Table 2. Phytochemical screening of *Peganum harmala* (leaves) hydromethanolic extracts (MM: hydromethanolic extract of Mechria region, MB: hydromethanolic extract of Bougntob region).

Tabela 2. Fitokemijski pregled hidrometanolnih izvlečkov *Peganum harmala* (listi) (MM: hidrometanolni izvleček regije Mechria, MB: hidrometanolni izvleček regije Bougntob).

Extract constituent	Test	Observation	Extract	
			MM	MB
Steroids	Liebermann–Burchard reaction	Purple to blue colour	+	+
Saponins		Foam on the surface	++	++
Tannins		Green color	+++	++
Quinones	Borntragers test		-	-
Phenols		Green-black	+	+
Coumarin glycosides		Green to yellow	++	++
Free anthraquinones		Red or pink colour	-	-
Combined anthraquinones		Pink, red or purple	-	-
Flavonoids		Pink-red or yellow	+	+
Alkaloids	Mayer	Colored precipitate	+	+
Cardiac glucosides		Brown ring	++	++
Proteins	Biuret test	Purple or pink colour	-	-

(-) absence, (+) presence, (++) presence in high quantity.

1.77%, (6) Tetrapentacosane 1.32%, (7) Dihydroactinidiolide 1.21%, (8) 2-Aminobenzaldehyde 1.03%. In contrast, the chromatographic analysis of the essential oil of *Pharmala* from the Mechria region demonstrated the presence of 47 volatile, constituting 43.6% of the total essential oil recovered from dry material. Chemical analysis of essential oil from Mechria region showed that its major products are: (1) Phytol 10.24%, (2) Carvone 5.92%, (3) Tetrapentacosane 2.80%, (4) Phytone 2.18%, (5) Butylated Hydroxytoluene 1.48%, (6) Lauric acid 1.39%, (7) Hexatriacontane 1.27%, (8) 3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldehyde 1.14%.

In a study by Ida et al.(2016), the chromatographic analysis of the essential oil of *P.harmala* from the Bousaada region demonstrated the presence of 45 volatile constituting 89% of total essential oil showed that its major products are Eugenol 17.5%, Thymol 7%, Carvone 2.7%.

The variations found in the chemical composition from

the qualitative and quantitative point of view of our samples compared to the study by Ida et al.(2016) may be due to some environmental factors (such as soil composition, geographical location and climate conditions), the part of the plant used, the age of the plant and the period of the growing season or even to genetic factors (Hussain et al., 2009; Anwar et al., 2009). The methods that use water can induce hydrolysis of esters and also rearrangements, isomerizations, racemizations, and oxidations (Bruneton et al., 1993).

Khadhri et al.(2011) also say that the variation in the percentage of the chemical composition of essential oils can be explained by the differences in the geographic origins, climate, nature of the soil, solar radiation, age of the plant and part of plants.

All these factors involve the activation or inactivation of certain enzymatic groups, leading to the predominance of a particular biosynthetic pathway (Khadhir et al., 2011).

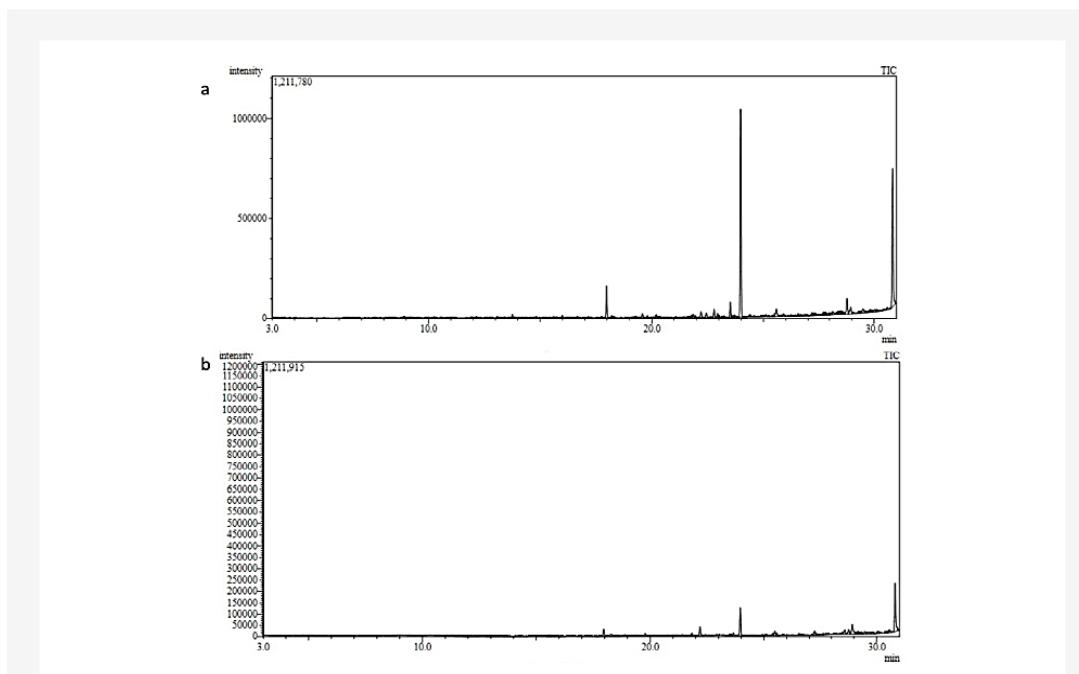


Figure 3. Gas chromatographic profiles the major constituents of *Peganum harmala* essential oils for two regions; a) Gas chromatographic profiles the major constituents of *Peganum harmala* essential oils for Bougtob region; b) Gas chromatographic profiles the major constituents of *Peganum harmala* essential oils for Mechria region.

Slika 3. Profili plinske kromatografije glavnih sestavin eteričnih olj *Peganum harmala* za 2 regiji; a) Profili plinske kromatografije glavnih sestavin eteričnih olj *Peganum harmala* za regijo Bougtob; b) Profili plinske kromatografije glavnih sestavin eteričnih olj *Peganum harmala* za regijo Mechria.

Table 3. Phytochemical components identified in *Peganum harmala* essential oil (Bougtnob region) by GC-MS.Tabela 3. Fitokemične sestavine, identificirane v eteričnem olju *Peganum harmala* (regija Bougtnob) z GC-MS.

Compound Name	Molecular Formula	RT (min)	Area (%)
Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	13.393	0.30
D - carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	13.758	0.53
Anisole	C ₁₀ H ₁₂ O	15.986	0.36
5,9-undecened-2-one, 6,10-dimethyl-, (e)-	C ₁₃ H ₂₂ O	16.655	0.31
Heptadecane, 8-methyl-	C ₁₈ H ₃₈	17.742	0.22
Carbamic acid	C ₁₇ H ₂₁ NO ₂	17.973	3.52
3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O	18.295	0.24
Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	18.816	0.13
Ketone	C ₈ H ₁₂ O	19.287	0.18
Ethanone, 1-(1,3a,4,5,6,7-hexahydro-4-hydroxy-3,8-dimethyl-5-azulene)-	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	19.584	0.56
Hexatriacontane	C ₃₆ H ₇₄	19.807	0.25
6,8-nonadien-2-one, 6-methyl-5-(1-methyl ethylidene)-	C ₁₃ H ₂₀ O	20.196	0.33
2-Benzyl-3-oxo propanoic acid, ethyl ester	C ₁₃ H ₁₆ O ₃	20.305	0.20
P-Cymen-7-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	21.670	0.23
Tetrapentaccontane	C ₂₄ H ₅₀	21.768	0.31
2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadiene-1-one	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	21.847	0.43
Phytone	C ₁₈ H ₃₆ O	22.205	0.82
Δ-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	22.438	0.67
2-aminobenzaldehyde	C ₇ H ₇ NO	22.786	1.03
Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	22.944	0.46
Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	23.514	1.77
Hexacontane	C ₆₀ H ₁₂₂	23.695	0.32
D-(+)-carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	23.978	21.15
Ar-tumerone	C ₁₅ H ₂₀ O	24.401	0.27
Octaborane	B ₈ H ₁₂	24.955	0.14
2-Nonen-1-ol, 2-methyl-	C ₁₀ H ₂₀ O	25.000	0.18
Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	25.110	0.32
Pentadecane, 8-hexyl-	C ₂₁ H ₄₄	25.495	0.31
Dihydroactinidiolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	25.578	1.21
Quinoline, 6-butyl-	C ₁₃ H ₁₅ N	25.818	0.19
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	C ₁₇ H ₃₀ OSi	25.901	0.36
Dihydroartemisinin, 6-dehydro-5-dehydroxy-3-deoxy-	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	26.246	0.18
Diethyl phthalate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	26.552	0.26
Solasonine	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₆	26.671	0.19
2-propenoic acid, 3-(dimethylamino)-3-ethoxy-, ethyl ester	C ₇ H ₁₄ O ₃	26.954	0.19
P-vinyl phenol	C ₈ H ₈ O	27.174	0.39
Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	27.260	0.34
4-quinoline carboxaldehyde	C ₁₀ H ₇ NO	27.315	0.35
Formamide, N-phenyl-	C ₇ H ₇ NO	27.695	0.40
Indole	C ₈ H ₇ N	27.782	0.32
5.alpha.-cholestan-6.beta.-amine, n,n-dimethyl-	C ₂₉ H ₅₃ N	27.962	0.31
Methanone, diphenyl-	C ₁₃ H ₁₂ N	28.154	0.48
N-Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	28.385	0.24

Ethyl ether	C ₂ H ₄ O	28.501	0.48
Phosphorochloridothioic acid, O,O-dimethyl ester	C ₂ H ₆ ClO ₂ PS	28.570	0.19
3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldehyde	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	28.615	0.29
Lauric acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	28.791	2.10
Tetrapentaccontane	C ₅₄ H ₁₁₀	28.950	1.32
3-methylheptadecane	C ₁₈ H ₃₈	29.328	0.30
1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 8-methylnonyl ester	C ₂₂ H ₃₄ O ₄	29.500	0.75
21- <i>xi</i> -methyl-17-isocholest-16-en-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₆ O	29.848	0.35
Triethylene glycol mono dodecyl ether	C ₁₈ H ₃₈ O ₄	30.058	0.44
Cyclohexanepropanol, α ,2,2,6-tetramethyl-	C ₁₃ H ₂₆ O	30.144	0.25
Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	30.595	0.33
Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	30.833	17.41

Table 4. Phytochemical components were identified in the *Peganum harmala* essential oil Mechria region by GC-MS.Tabela 4. Fitokemične sestavine, identificirane v eteričnem olju *Peganum harmala* Mechria regija z GC-MS.

Compound Name	Molecular Formula	RT (min)	Area (%)
Thiirane, octyl-	C ₁₀ H ₂₀ OS	14.355	0.38
Phosphoric acid	C ₁₅ H ₄₁ O ₆ PSi ₄	14.962	0.36
Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	15.602	0.33
Methyl 2,6-anhydro- α -D-altroside	C ₇ H ₁₂ O ₅	15.853	0.52
Butanedioic acid, decyl phenylmethyl ester	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	17.162	0.38
2-Methyl-decahydro-4-quinolone	C ₁₀ H ₉ NO	17.268	0.29
Butylated Hydroxytoluene	C ₁₅ H ₂₄ O	17.960	1.48
β -Ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	18.182	0.38
2-Butenoic acid	C ₁₈ H ₂₂ NO ₅	18.288	0.69
2-Nonadecene	C ₁₉ H ₃₈	19.147	0.38
Cyclobutaneacetamide, N-(4-methoxyphenyl)	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	19.288	0.34
Citronellyl valerate	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	19.427	0.43
Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	19.780	0.63
o-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	20.255	0.24
Hexane, 2,3,4-trimethyl	C ₉ H ₂₀	20.529	0.23
Phenanthrene, 3-methyl-	C ₁₅ H ₁₂	20.785	0.57
Propanoic acid, ethyl ester	C ₅ H ₁₀ O ₂	21.060	0.21
Pentanoic acid, 5-hydroxy-2-propyl	C ₁₄ H ₃₂ O ₃ Si ₂	21.206	0.23
Perhydro-htx-2-one, 2-depentyl-, acetate ester	C ₁₆ H ₂₇ NO ₃	21.411	0.23
13-Methyltritriacontane	C ₃₄ H ₇₀	21.735	0.25
2,6-Di(<i>t</i> -butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	21.833	0.62
Phytone	C ₁₈ H ₃₆ O	22.189	2.18
Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	23.499	0.46
Phytol acetate	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	23.567	0.37
Tetrapentaccontane	C ₅₄ H ₁₁₀	23.657	0.71
Carvone	C ₁₀ H ₁₆ O	23.960	5.92
Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	25.090	0.33
Hexatriacontane	C ₃₆ H ₇₄	25.472	1.27
2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	25.562	0.37
Quinoline, 6-butyl-	C ₁₃ H ₁₅ N	25.828	0.32

α -Pyrrolidone, 5-[2-butyrylethyl]-	$C_{10}H_{17}NO_2$	26.016	0.42
Malonic acid, 6-heptynyl	$C_{15}H_{28}O_4$	26.285	0.39
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester	$C_{12}H_{14}O_4$	26.541	0.63
Dotriaccontane	$C_{32}H_{66}$	27.233	1.13
Spiro[cyclopropane-1,2'(1'h)-phenanthrene]-1',4'(3'h)-dione, 8'-(formyloxy) methyl]-4'b,5',6',7',8',8'a,9',	$C_{21}H_{28}O_7$	27.281	0.34
1,3,2-Dioxaphosphorinane, 2-(benzyloxy)-2-oxo-	$C_{10}H_{13}O_4P$	27.811	0.57
2-(2-Bromo-ethyl)-3-methyl-oxirane	C_5H_9BrO	28.377	0.23
3-Quinuclidinol	$C_7H_{13}NO$	28.508	0.47
3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldehyde	$C_{15}H_{22}O_2$	28.600	1.14
Lauric acid	$C_{12}H_{24}O_2$	28.773	1.39
Benzenamine, 2,4-dinitro-N-phenyl-	$C_{12}H_9N_3O_4$	28.840	0.36
Tetrapentaccontane	$C_{54}H_{110}$	28.924	2.80
Phosphonic acid, bis(1-methylethyl) ester	$C_6H_{15}O_3P$	29.059	0.40
Pentadecane, 2,6,10-trimethyl-	$C_{18}H_{38}$	29.181	0.55
1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 8-methylnonyl ester	$C_{22}H_{34}O_4$	29.477	0.68
Tetrapentaccontane	$C_{54}H_{110}$	30.554	0.76
Phytol	$C_{20}H_{40}O$	30.808	10.24

Antibacterial activity

The essential oil of *P.harmala* leaves of two regions has good inhibitory activity in vitro against the microorganisms tested. However, the microorganisms did not show the same sensitivity to the essential oil.

This essential oil has strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* (inhibition zone 36 mm MIC: 10.5 μ g/ml and 33 mm MIC: 11.5 μ g/ml) and *Bacillus cereus*, (inhibition zone 21.7 mm MIC: 15 μ g/ml and 18 mm MIC: 17.5 μ g/ml) and very strong antifungal, *Candida albicans* (inhibition zone 25 mm MIC: 09.0 μ g/ml and 22.5 mm MIC: 11.5 μ g/ml) and *Aspergillus brasiliensis* (inhibition zone 18 mm MIC: 7.5 μ g/ml and 17.5 mm MIC: 10.5 μ g/ml). The essential oils have moderate antibacterial activity against Gram-negative bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* (inhibition zone 10.5 mm MIC: 19.5 μ g/ml and 8.5 mm MIC: 21 μ g/ml), *Klebsiella pneumonia* (inhibition zone 13.5 mm MIC: 17.5 μ g/ml and 12 mm MIC: 18.5 μ g/ml), *Escherichia coli* (inhibition zone 17 mm MIC: 14.5 μ g/ml and 15.5 mm MIC: 12 μ g/ml) due to the presence of lipopolysaccharide barrier (LPS), which has a role in protecting bacteria against antibacterial agents.

Gram-negative bacteria are more resistant to essential oils than Gram-positive bacteria due to the structure of their outer membrane. Thus, the outer membrane of Gram-negative is richer in lipo-polysaccharides and proteins (Toure et al., 2015).

Conclusions

In this study, we determined the chemical composition and the antimicrobial activity of essential oil from the leaves of *Peganum harmala* grown in the region of Bougtnob and Mechria. Fifty-five compounds have been identified in the essential oil of the sample of the first region, Carvone 21.15%, Phytol 17.41%, Carbamic acid 3.52%, Lauric acid 2.10%, and Thymol 1.77%, Tetrapentaccontane 1.32% were the major compounds. In the sample of the region of Mechria, 47 compounds were identified when Phytol 10.24%, Carvone 5.92%, Tetrapentaccontane 2.80%, Phytone 2.18%, Butylated Hydroxytoluene 1.48%, and Lauric acid 1.39% were the dominant. This difference in composition is due to several factors, such as soil composition, geographical location and climate conditions.

Phytochemical screening in the leaves of *P.harmala* showed the presence of flavonoids, alkaloids, saponins, tannins, glycosides, terpenoids and steroids and the absence of anthraquinones.

The antimicrobial effectiveness of the essential oil of *P.harmala* from southern Algeria has been demonstrated against five bacteria and fungi. This essence showed strong antimicrobial activity against all the tested strains. In general, Gram-positive bacteria and fungi were found to be more sensitive to the essential oils than Gram-negative bacteria. This great power is attributed mainly to their high

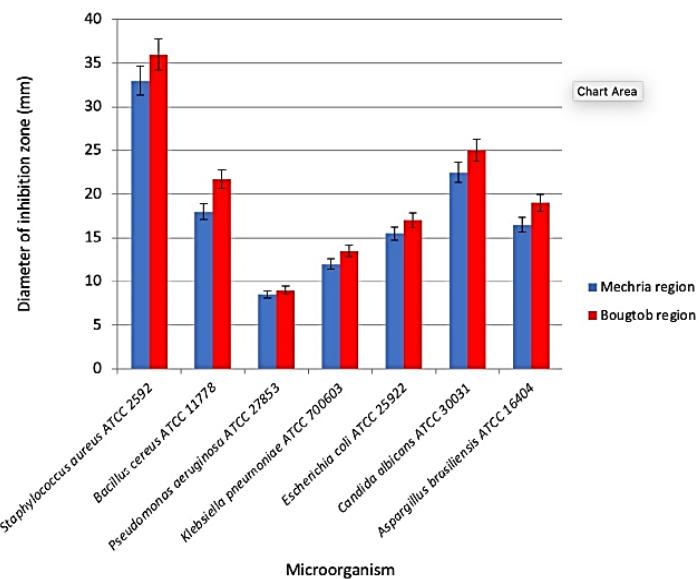


Figure 4. Zones of growth inhibition (mm) are used using a direct contact technique in an agar medium for the antimicrobial activity of *Pharmala* essential oils.

Slika 4. Območja zaviranja rasti (mm) so s tehniko neposrednega kontakta v agarskem mediju protimikrobná aktivnosť eteričných olí *Pharmala*.

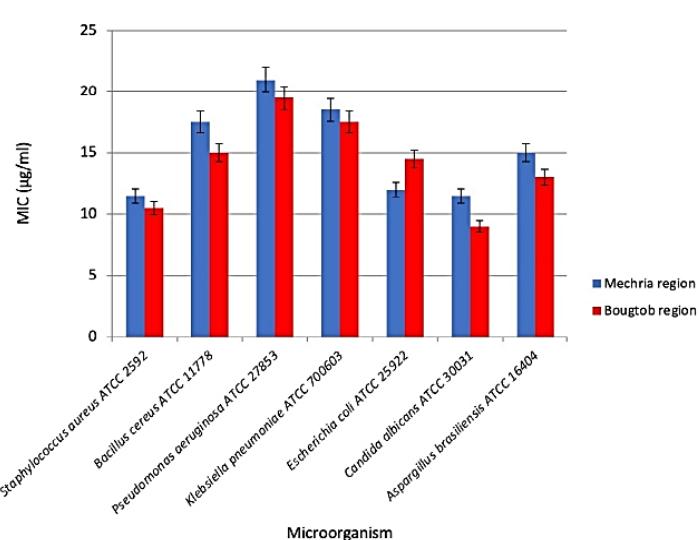


Figure 5. MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) using microdilution method in 96 multwall microliter plates showing antimicrobial activity of *P.harmala* essential oils.

Slika 5. MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) z metodo mikrorazredčevanja v 96 večstenskih mikrolitrskih ploščah, ki prikazuje protimikrobeno delovanje eteričnih olj *P.harmala*.

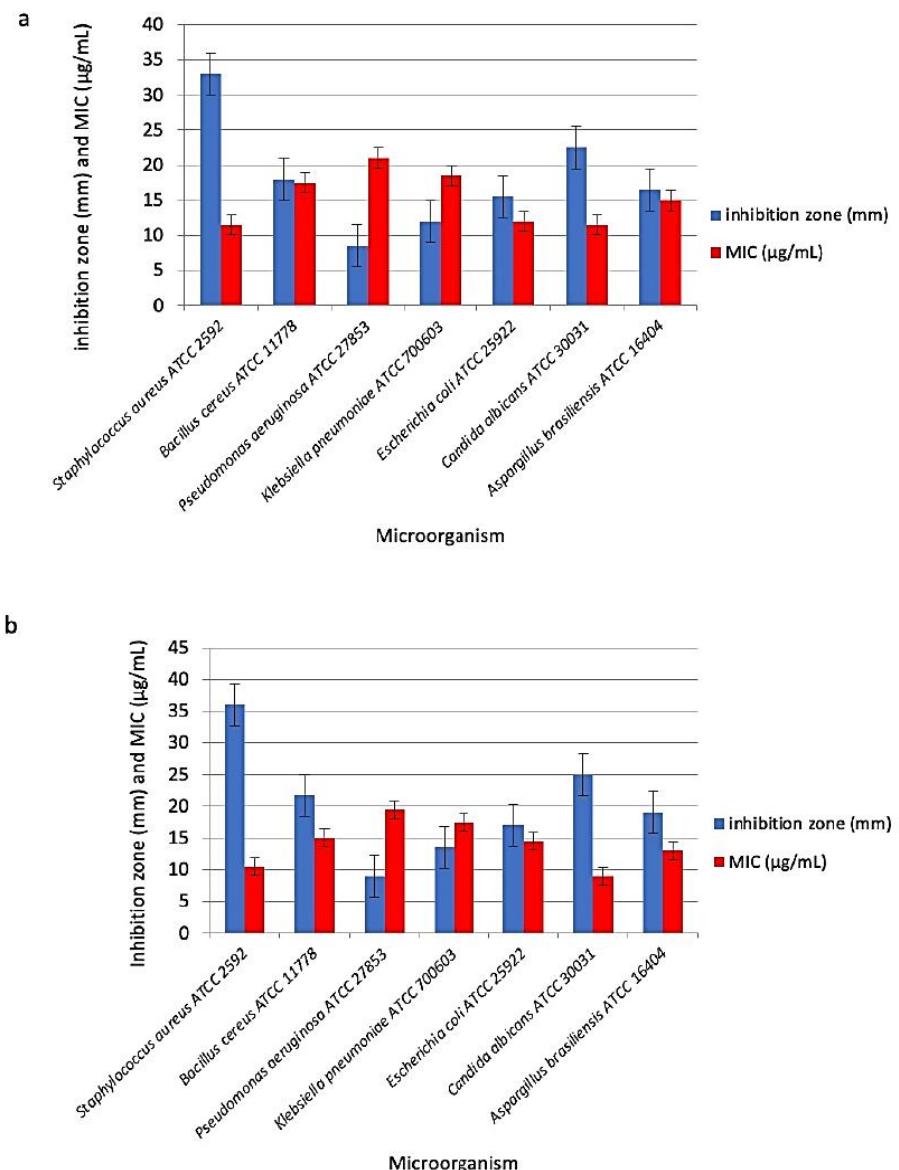


Figure 6. Comparison of Diameter of inhibition zone and MIC for the individual bacteria/fungi for two regions; a. Comparison of Diameter of inhibition zone and MIC for the individual bacteria/fungi for Mechria region; b. Comparison of the Diameter of the inhibition zone and MIC for the individual bacteria/fungi for the Bougrob region

Slika 6. Primerjava premera inhibicijskega območja in MIC za posamezne bakterije/glive za 2 regije; a. Primerjava premera inhibicijskega območja in MIC za posamezne bakterije/glive za regijo Mechria; b. Primerjava premera inhibicijskega območja in MIC za posamezne bakterije/glive za regijo Bougrob

contents in oxygenated terpenes (Carvone, Phytol and Lauric acid). However, the antimicrobial activity registered confirms some of the traditional uses of the plant in the treatment of some diseases.

As a final remark, it is also vital to mention that the essential oil of *Peganum harmala* is a domain where much remains to be studied to exploit its properties.

Author Contributions

Conceptualization, G.A. and C.O.; methodology, G.A. and C.O.; software, G.A.; validation, G.A., C.O., K.F. and F.Z.; formal analysis, F.Z.; investigation, C.O. and K.F.; data curation, G.A., C.O., K.F., F.Z., and D.Z.; writing original draft preparation, G.A., C.O., K.F., F.Z., and D.Z.; writing review and editing, G.A., C.O., K.F., F.Z., and D.Z.; visualization, C.O.; supervision, C.O.; project administration, C.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgement

Thanks to the members of the laboratories of the Faculty of Natural and Life Sciences at the Universities of Mascara

Funding

This research received no external funding

Data Availability

Data are available upon request to the corresponding author.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

Abudunrin, T., Uhuegbu, C., and Olugbuyiro, J., 2015. Phytochemical analysis of leaf-extracts from eight tropical trees: Prospects for environmentally-friendly dye compounds for smart windows. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 6(3), 682-698.

Adou, L.M.D., Kone, M.W., Ipoou, J.I., N'guessan, E.K., 2016. Ethnobotanique et analyse phytochimique qualitative de *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn (Dennstaedtiaceae), une Ptéridophyte utilisée comme plante médicinale en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(4), 1783-1792. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v10i4.27>.

AFNOR. Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles 2000; 663 pp.

Amezouar, F., Badri, W., Hsaine, M., Bourhim, N., Fougrach, H., 2013. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Erica arborea* L. *Pathologie-Biologie*, 61(6), 254-258. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2013.03.005>

Anwar, F., Ali, M., Hussain, A.I., Shahid, M. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal*, 24, 170-176.

Bahmani, M., Rafieian-kopaei, M., Parsaei, P., Mohsenzadegan, A. 2012. The anti-leech effect of *Peganum harmala* L. extract and some anti-parasite drugs on *Limnatis nilotica*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(10): 2586-2590.

Billerbeck, V.C., Roques, C., Vaniére, P., Marquier, P., 2002. Activité antibactérienne et antifongique des produits à bases d'huiles essentielles. *Hygiénies*, 3, 248-251.

Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., Bessiere, J.M., 2003. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 481-484.

Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M., Chaabouni, M.M., 2008. Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperusphoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, 119-125.

Bruneton, J., 1993. Pharmacognosy, Phytochemistry medicinal plants. Technical and documentary, 3rd edition., 634 pp.

Centers for Disease Control and Prevention, 2013. *Office of Infectious Disease Antibiotic resistance threats in the United States*, Apr 2013.

Chouitah, O., 2017. Essential oil from the leaves of *Ajuga iva*: Chemical Composition and Antimicrobial Activity, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(3), 873-877.

Davis, J., 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 246, 375-382.

Dean, S.G., Ritchie, G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal Food Microbiology*, 5, 165-180.

Fauchère, J.L., Avril, J.L., 2002. General and medical bacteriology. Ellipses Editions Paris, 365 pp.

Gilles, M., Zhao, J., An, M., Agboola, S., 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*, 119: 731-737.

Haddouchi, F., Benmansour, A., 2008. Huiles essentielles, utilisation et activités biologiques Application à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoires, 3(8), 20-27.

Haddouchi, F., Chaouche, T., Halla, N., 2016. Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. Phytothérapie, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1086-8>

Hossain, M.A., Al-raqmi, K.A.S., AL-mijizy, Z.H., Weli, A.M., AL-Riyami, Q., 2013. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 3(9), 705- 710. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60142-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60142-2)

Hussain, A.I., 2009. Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae. Doctorate thesis in chemistry. University of agriculture, Faisalabad, Pakistan, 257 pp.

Ida, A., Luigi, A., Lucia, C., Vincenzo, D., Florida, F., Filomena, N., Lucèia, F.S., Maroua, K., 2016. Chemical composition, antibacterial and phytotoxic activities of *Peganum harmala* seed essential oils from five different localities in Northern African Journal of Molecules, 21, 1235.

Ismail, A.M., Mohamed, E.A., Marghany, M.R., Abdelmotaal, F.F., Abdel-farid, I.B., EL-sayed, M.A., 2016. Preliminary phytochemical screening, plant growth inhibition and antimicrobial activity studies of *Faidherbia albida* legume extracts. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 15(2), 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.002>

Joshi, A., Bhowe, M., and Sattarkar, A., 2013. Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcos Linn*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 5(7), 80-87.

Khadhir, A., El Mokni, R., Mguis, K., Ouefelli, I., Araújo, M.E.M., 2011. Variability of two essential oils of *Ammivisnaga* (L.) Lam. a traditional Tunisian medicinal plant. Journal of Medicinal Plants Research, 5(20), 5079-5082.

Kumar, B.R., 2015. Preliminary test of phytochemical screening of crude ethanolic and aqueous extract of *Moringa pterygosperma* Gaertn. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 4(1), 7-9.

Maria, R., Shirley, M., Xavier, C., Jaime, S., David, V., Rosa, S., Jodiea, D., 2018. Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. Journal of King Saud University-Science, 30(4), 500-505. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.009>

Marino, M., Bersani, C., Comi, G., 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology, 67(3), 187-195.

Marwat, S.K., ur Rehman, F., 2011. Chapter 70 - Medicinal and Pharmacological Potential of Harmala (*Peganum harmala* L.) Seeds. In: Reedy, V.R., Watson, R., Patel, V.B. (Eds) Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. London: Academic Press, pp. 585-599.

NIST National Institute of Standard Library, 2002. The Perkin Elmer Corporation. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania, USA, Twelfth International Supplement; M100-S12.

Pandey, M.M., Rastogi, S., Rawat, A.K.S., 2013. Indian traditional ayurvedic system of medicine and nutritional supplementation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 1-12.

Quezel, F., Santa, S., 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol. 1-2. Ed. CNRS, Paris France.

Rashid, C.A., Qureshi, M.Z., Raza, S.A., William, J., Arshad, M., 2010. Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*, Analele University Bucureşti - Chimie, 19(1), 23-30.

Read, A.F., Woods, R.J., 2014. Antibiotic resistance management. Evolution, Medicin, and Public Health, 2014(1):147. doi: 10.1093/emph/eou024.

Roosta, R.A., Moghaddasi, R., Hosseini, S.S., 2017. Export target markets of medicinal and aromatic plants. Journal of applied research on medicinal and aromatic plants, 7, 84-88.

Rudramurthy, G.R., Swamy, M.K., Sinniah, U.R., Ghasemzadeh, A., 2016. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. Molecules, 21(7), 7-8.

Samarth, R.M., Samarth, M., Matsumoto, Y., 2017. Medicinally important aromatic plants with radioprotective activity. Future Science OA, 3(4): 1-26.

Smânia, A., Monache, F.D., Smânia, E.F., Gil, M.L., Benchetrit, L.C., Cruz, F.S., 1995. Antibacterial activity of substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. Journal of Ethnopharmacology, 45(3), 177-81.

The antibiotic alarm. Nature 2013, 495(7440):141. doi: 10.1038/495141a.

Toure, D., 2015. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire. Doctorate thesis in biochemistry. University of Félix Houphouët-Boigny.

Zargari, A., 1992. Medicinal Plants. Tehran: Tehran University Publication, 448 pp.

Tableau 19. Huiles essentielles les plus produites, valeur en millions de € et principaux pays producteurs en 2019 (FranceAgriMer, 2020).

Huiles essentielles	Production en tonnes	Valeur en millions €	Principaux pays producteurs
Orange douce	49000	294	Brésil, USA, Dominique, Italie, Espagne, Israël, Argentine
Menthe des champs (<i>Mentha arvensis</i>)	42000	840	Inde, Chine, Brésil
Citron	9000	225	Argentine, Italie, USA, Brésil, Israël
Eucalyptus (<i>globulus</i>)	4000	88	Chine, Inde, Australie, Brésil
Menthe poivrée (<i>Mentha piperita</i>)	3500	112	Inde, USA
Citronnelle	3000	81	Chine, Indonésie, Inde
Clou de girofle	2500	52	Madagascar, Indonésie, Tanzanie, Sri Lanka, Inde
Menthe douce/verte (<i>Mentha spicata</i>)	2000	58	USA, Inde, Chine
Cèdre	2000	-	Chine, USA, Inde, Maroc
Lavandin	1550	42	France, Espagne
Patchouli	1400	69	Indonésie, Chine, Malaisie
Lime	1000	-	Mexique, Pérou, USA, Haïti, Brésil, Cuba, Côte d'Ivoire, Italie, Inde

Tableau 20. Principaux pays exportateurs d'huiles essentielles et part du marché en 2020
(FranceAgriMer, 2021).

Rang	Pays	Valeurs des exportations		Variation 2020/2019 (%)
		en 2020 (million €)	Part de marché en 2020 (%)	
1	Etats-Unis	610	16,6	+0,1
2	France	387	10,5	+2,8
3	Inde	360	9,8	-53,3
4	Chine	250	6,8	-13,2
5	Pays-Bas	191	5,2	+33,7
6	Argentine	175	4,7	-9,5
7	Brésil	172	4,7	-7,0
8	Allemagne	156	4,2	+3,9
9	Indonésie	146	4,0	+20,7
10	Angleterre	137	3,7	-5,3

Tableau 21. Principaux pays importateurs d'huiles essentielles et part du marché en 2020
(FranceAgriMer, 2021).

Rang	Pays	Valeurs des importations		Variation 2020 / 2019 (%)
		en 2020 (million €)	Part de marché en 2020 (%)	
1	Etats-Unis	801	21,1	-5,6
2	France	323	8,5	-8,9
3	Allemagne	283	7,5	-6,4
4	Pays-Bas	221	5,8	+4,9
5	Chine	219	5,8	+2,6
6	Irlande	183	4,8	+10,8
7	Angleterre	181	4,8	-9,3
8	Japon	146	3,9	-16,2
9	Singapour	119	3,1	-9,9
10	Inde	118	3,1	-79,3

 **Coloration de Gram :****- Mode opératoire :****- Réalisation des frottis :**

Prendre 0.01 ml de l'échantillon à analysé. Etaler l'échantillon en couche mince et régulière. Séchage et fixation du frottis au-dessus de la flamme du bec Bunsen pendant 5 min.

- Réalisation de la coloration :

- Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.

-Rejeter le colorant en inclinant la lame. Ne pas laver.

- **Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée)** : étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée.

On peut -réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.

- **Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone)** : verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration.

-Rincer sous un filet d'eau distillée.

-Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute.

-Laver doucement à l'eau distillée.

-Sécher la lame sur au-dessus de la flamme du bec Bunsen

-Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100x.

-Remarque:

Les bactéries Gram positifs sont colorées en bleu ou violet et les bactéries Gram négatifs sont colorées en rouge ou rose.

 **Généralités sur quelques souches utilisés****1) *Staphylococcus aureus***

Staphylococcus aureus est une bactérie de la famille des *Staphylococaceae*. Appelée également staphylocoque doré, cette bactérie halophile est de forme sphérique, de 0,5 µm à 1,5 µm de diamètre, disposée généralement en grappes de raisin. C'est une bactérie immobile, asporulée et aérobiose facultatif qui possède une catalase et une coagulase libre. La température et le pH optimaux pour sa croissance 35 -41°C et 6-7 respectivement. Elle est ubiquitaire présente sur la peau, les muqueuses et la sphère rhinopharyngée de l'être humain (**Hart & Shears, 1997** ; **Anses, 2016b** ; **Richard, 2016**). Elle est résistante aux β-lactamines, aux aminosides, aux fluoroquinolones, aux glycopeptides, aux tétracyclines, aux macrolides et aux lincosamides (**Prescott et al., 2003** ; **Tortora et al., 2003**).

2) *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est un bacille ovoïde en chaîne à Gram positive ayant un diamètre d'environ 1.0 – 1.2 µm et une longueur de 3.0 – 5.0 µm, anaérobiose facultatif, sporulé, mobile, non capsulé, glucose + et catalase +. La bactérie se multiplie à des pH compris entre 4,3 et 9,3 et à une température qui s'étend de 5 à 50°C. Cette souche est très répandue dans la nature et souvent isolée du sol, de la poussière ou de la surface des végétaux, ce qui favorise sa propagation dans les aliments (**Hart & Shears, 1997** ; **Six, et al., 2012**, **Anses, 2016a** ; **Richard, 2016**). *B. cereus* est naturellement résistante à la pénicilline G et aux amino- et carboxypénicillines, au triméthoprime et à la colistine. Cependant, les céphalosporines sont peu actives (**Prescott et al., 2003** ; **Tortora et al., 2003**).

3) *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm de long, non sporulé, mobile grâce à un ou plusieurs flagelles polaires, aérobiose à métabolisme strictement respiratoire. La bactérie est catalase +, oxydase +, Lactose - et non indologène. Sa culture est aisée entre 10° C et 42°C et à un

PH neutre. C'est une bactérie ubiquitaire présente généralement dans les eaux, le lait cru et fromages et les légumes. Ses propriétés de virulence lui donnent une capacité de croissance au détriment de nombreux hôtes dont l'Homme : au niveau du tractus digestif, de la voie oto-rhino-laryngologique et de la peau (Anses, 2010 ; Richard, 2016). *P. aeruginosa* est résistante à différentes familles d'antibiotiques : Pénicillines, Tétracycline, Triméthoprime, Quinolones, β -lactamines, Aminosides et Fluoroquinolone (Prescott *et al.*, 2003 ; Tortora *et al.*, 2003).

4) *Escherichia coli*

Escherichia coli est un Bacille à Gram négatif non sporulé, mobile grâce à une ciliature péritriche, mesurant de 2 à 4 μm de long et d'un diamètre d'environ 0,6 μm . Elle est aéro-anaérobie, Lactose +, glucose +, catalase +, oxydase -. Sa température de multiplication est comprise entre 7 et 46°C. Cette souche fait partie de la microflore commensale intestinale de l'Homme et de nombreux animaux à sang chaud et représente près de 80% de la microflore aérobie (Ghebru, 1988 ; Richard, 2016 ; Anses, 2019). *E. coli* est naturellement sensible à certains antibiotiques : pénicillinases, céphalosporinases, aminosides et fluoroquinolones (Prescott *et al.*, 2003 ; Tortora *et al.*, 2003).

Milieux solides

Gélose nutritive

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Peptone de gélatine	05
Extrait de viande	03
Extrait de levure.....	03
Chlorure de sodium	05
Agar	18
pH= 7.3	

Gélose Chapman

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Peptone.....	10
Extrait de viande	01
Mannitol	10
Chlorure de sodium	75
Rouge de phénol	0.025
Agar	15
pH= 7.3	

Gélose Hektoen

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Protéose-peptone	12,0
Extrait de levure :	3,0
Lactose :	12,0
Saccharose :	12,0
Salicine :	2,0
Citrate de fer III et d'ammonium	1,5
Sels biliaires :	9,0
Fuchsine acide	0,1
Bleu de bromothymol :	0,065
Chlorure de sodium :	5,0
Thiosulfate de sodium :	5,0
Agar	14,0
pH = 7,6	



a. Avant l'ajout de KOH



b. Après l'ajout de KOH

Figure 68. Résultat de l'analyse de l'indice d'acide des huiles essentielles de *P.harmala*