

## II.1. Principe adopté :

Notre étude a pour but de déterminer les effets biologiques des huiles essentielles de *Peganum harmala l* qui est abondant dans la wilaya de Ghardaïa.

## II.2. Choix de la matière végétale :

On fait la récolte de *peganum harmala l* dans le Oued de Metlili au cours de la période Mars -Avril de 2012 au stade végétatif.

### II.2.1 Peganum harmala l :

Est une plante de la famille des *Zygophyllacées*. Connue depuis des siècles, elle est employée en médecine traditionnelle et dans beaucoup d'autres domaines (OUARED, 2008).

#### II.2.1.1. Nomination :

Harmel; Armel; L'Harmel (*au Maghreb*).Bender tiffin en Tamachek (*Touareg*).Espand; Esfand; Hormol; Spélanè (*en Afghanistan*).Rue sauvage; Rue verte; Pégane (*en France*).Harmel Sahari (*en Algérie*).Bizr el Hharmel (*en Egypte*) (OUARED, 2008)

#### II.2.1.2 Classification :

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

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Rosidae</i>
Order	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Zygophyllaceae</i>
Genre	<i>Peganum</i>
Espèce	<i>Peganum harmala linne, 1753</i>

**Tableau 01** : La systématique de *Peganum harmala l*.

### II.2.1.4 Description :

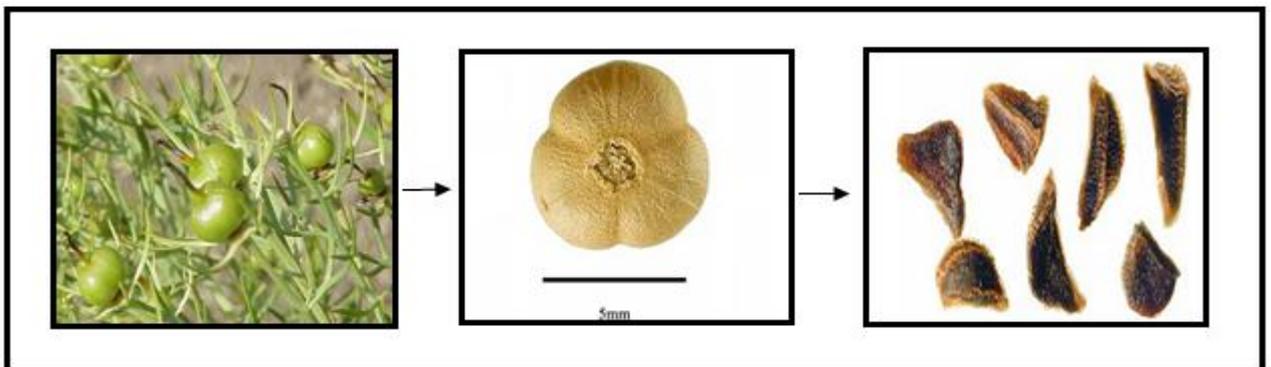
Plante herbacée vivace, poussant en grosses touffes buissonnantes de couleur vert sombre pouvant atteindre 50 de haut (Photo 01).



**Photo 01:** *Peganum harmala l*

(Hadjer+Rachida : original 09 mars 2012 à Oued Metlili de *Ghardaïa*).

- Tiges : très rameuses.
- Feuilles : allongées divisées en multiples lanières très fines.
- Fleurs : grandes, blanches, pourvues de sépales d'effilés, supportées par de longs pédoncules, s'épanouissent à l'extrémité des tiges portées.
- Fruits en petites capsules sphériques, renfermant des graines noires (Figure 29).



**Figure 29 :** les fruites et les graines de *peganum harmala l* (OUARED, 2008).

Il faut noter que toute la plante est malodorante (CHEHMA, 2006; MESSAOUDI, 2005).

- Période de végétation : Floraison en mars-avril (CHEHMA, 2006).

### II.2.1.5 Distribution géographique :

*Peganum harmala*, plante endémique des zones semi- arides et dans les terrains sableux et les lits d'oued et à l'intérieur même des agglomérations. leur origine est Asie centre et Syrie .Se développe dans les zones sahariennes du Nord du continent africain (Maroc oriental, Sahara septentrional et hauts plateaux algériens, Tunisie) et se prolonge jusqu'au Nord de l'Inde et en Nord de la Chine. et elle existe aussi en Europe centrale (Espagne, steppes de la Russie méridionale, Hongrie) (OZANDA, 1977; ABBASSI et al. 2003; OUARED; 2008).

### II.2.1.6 Utilisation :

Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle et en pharmacologie pour traiter différents troubles:

- *gynécologiques*: emménagogue, abortif, stérilité féminine
- *généraux*: hypnotique, antipyrétique, antalgique, antitussif
- *digestifs*: coliques, troubles digestifs (forme de fumigation ou en macérât)
- *cutanés*: antiseptique et cicatrisant, dermatoses (eczémas) et brûlures, conjonctivites purulentes et blépharites, alopécie
- *infectieux*: tétanos néonatal; anthelminthique (ascaris, toenia); antipaludique; oreillons
- *autres*: diabète, hypertension artérielle, les crises du nerf sciatique et les rhumatismes (la plante fraîche, écrasée, est utilisée en frictions) (HAZARD, 1950; MERAD, 1973; BOUKEF, 1982; LE FLOCH, 1983; BELLAKHDAR, 1997).

C'est une espèce très toxique pour les animaux et l'homme en particulier Les principales toxines sont des alcaloïdes dont la structure chimique associe un noyau indole à un noyau pyridine: harmane, harmine, harmaline, harmalol (= harmol).

Toute la plante est toxique mais le taux d'alcaloïdes est beaucoup plus élevé dans la graine (3 à 4 %) que dans la racine, la tige (0,36 %) et la feuille (0,52 %) (BEN SALAH et al., 1986 ; AGEL et HADIDI, 1991;1994; BRUNETON1993).

Elle est responsable de la paralysie du système nerveux et entraîne la mort par arrêt respiratoire chez les vertébrés, elle est également abortive et anti-fertilisante chez les rats (NATH et al., 1993), comme elle peut provoquer l'interruption de grossesse chez les femmes (BELLAKHDAR, 1997).

## II.3. Choix de la matière microbienne:

### II.3.1. Les bactéries :

Le choix des bactéries a été porté sur trois souches fréquentes en pathologie humaine. Ces espèces sont souvent responsables de toxi-infections alimentaires (TIA) constituant ainsi un problème majeur de santé publique, et par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens. Nous avons sélectionné deux groupes de bactéries :

- **Des bactéries à Gram négatif** : *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*.
- **Des bactéries à Gram positif** : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces souches nous ont été fournies aimablement par les responsables de laboratoire de Ibn Rochd Ces souches ont été procurées dans des tubes stériles contenant 10ml de gélose de conservation.

#### II.3.1.1. *Escherichia coli* :

##### II.3.1.1.1. Habitat :

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *Escherichia coli* ou colibacille (Photo 02) est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (NAUCIEL et VILDE, 2005).



**Photo 02:** *Escherichia coli* ([www.geniebio.ac-aix-marseille.fr](http://www.geniebio.ac-aix-marseille.fr))

### II.3.1.1.2. Classification :

*Escherichia coli* est classé comme il est montré dans le tableau 02 :

Domaine	<i>Eubacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli T.Eschich</i>

**Tableau 02** : Position systématique de *Escherichia coli* (DELARRAS, 2007).

### II.3.1.1.3. Caractères principaux :

Bacille, Gram négatif, mobile (à ciliature péritriche) aéro-anaérobie facultatif, température optimal : 37°C, oxydase(+), Lac(+), Ind(+), urease(-), VP(-), PDA(-), NO<sub>3</sub>(+), TSI(-), Cit(-) (TONY et PAUL, 1997 ; FAUCHERE et AVRIL, 2002; NAUCIEL et VILDE, 2005; DELARRAS, 2007).

### II.3 .1.1.4. Pouvoir pathogène :

- ✓ **Infection urinaire** : plus fréquente chez la femme en raison de la brièveté, chez l'homme l'infection est généralement secondaire à un obstacle sur les voies urinaires.
- ✓ **Infection intestinale** : responsable de gastro-entérites.
- ✓ **Infection néonatale** : peut se traduire par une méningite ou une septicémie.
- ✓ **Infection diverses** : *Escherichia coli* est impliqué dans nombreuse infection à point de départ digestif ou urinaire : suppuration localisées ou septicémies, il peut s'agir d'infections communautaires ou nosocomiales (FAUCHERE et AVRIL, 2002)

### II.3.1.1.5. Sensibilité aux antibiotiques :

La bactérie était initialement sensible à beaucoup d'antibiotique, mais l'acquisition de résistances est fréquente, surtout en milieu hospitalier (NAUCIEL et VILDE, 2005). Cependant la résistance aux amino et aux carboxipénicillines par production de pénicillinase défasse 40

des souches, une partie de ces souches résistent à l'association amoxicilline-acide clavulanique, pour les autres antibiotiques, les fréquences de résistance sont faibles à l'exception des sulfamides (59%), et tétracyclines (40%) et du chloromphimcol (25%) (CHERRAD et AMRANI, 2005).

### II.3.1.2. *Klebsilla pneumonie*:

#### II.3.1.2.1. Habitat :

Espèce ubiquiste (Photo 03), isolées des eaux de surface, des eaux usées, des effluents industriels (papeteries, minoteries, usines textiles), du sol, du bois, de végétaux divers et des aliments et également retrouvé dans la flore fécale d'environ 30% des animaux et de l'homme et ils existent à l'état commensal sur la peau et les muqueuses, notamment les muqueuses respiratoires.

Le portage digestif de *Klebsiella* est plus important chez les malades hospitalisés que dans la population normale (FAUCHERE et AVRIL, 2002).



**Photo 03 :** *Klebsilla pneumonie*. (<http://www2.truman.edu>)

#### II.3.1.2.2. Classification :

*Klebsiella pneumonie* est classé comme il est montré dans le tableau 03 :

Domaine	<i>Eubacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobactriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Klebsiella</i>
Espèce	<i>klebsiella pneumonie</i>

**Tableau 03 :** Position systématique de *klebsiella pneumonie* (DELARRAS, 2007).

### II.3.1.2.3. Pouvoir pathogène :

La bactérie peut provoquer des infections broncho-pulmonaires en réanimation, des infections nosocomiales (septicémies et méningite post-chirurgicale en neurochirurgie) et des infections urinaires.

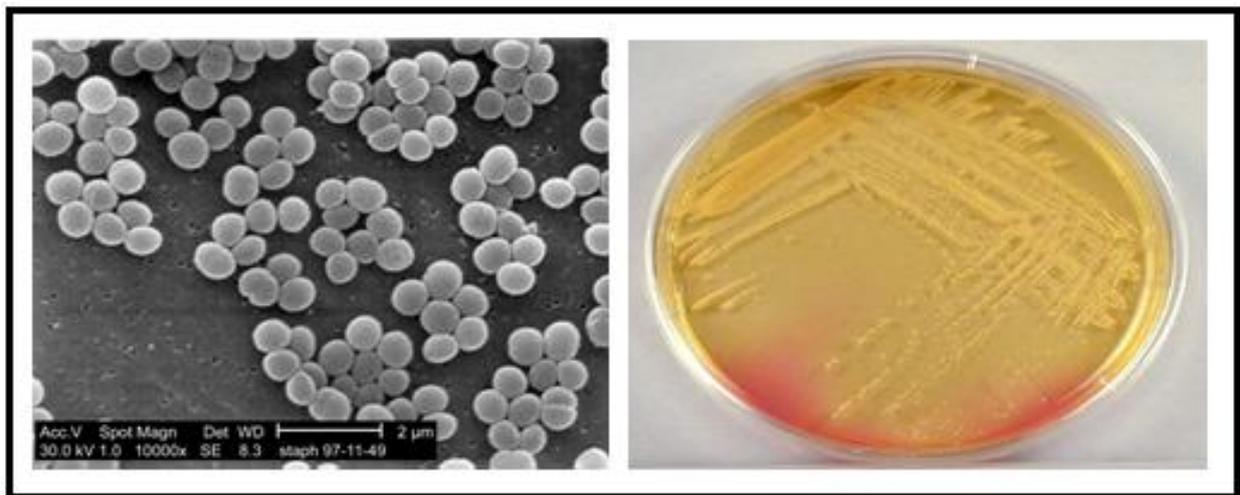
### II.3.1.2.4. Sensibilité aux antibiotiques :

Elles sont résistantes naturellement aux amino et carboxy-pénicillines. Elles possèdent souvent des enzymes appelées  $\beta$ -lactamase entraînant la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (BELKACEMI et KASINI, 2010).

### II.3.1.3. *Staphylococcus aureus* :

#### II.3.1.3.1. Habitat :

C'est un germe ubiquitaire, trouvé dans le sol, l'air. C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme (Photo 04). On le trouve à l'état normal dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles, au niveau du périnée ou des aisselles (FAUCHERE et AVRIL, 2002).



**Photo 04 :** *Staphylococcus aureus*. (<http://www.sciencephoto.com>)

**II.3.1.3.2. Classification :**

*Staphylococcus aureus* est classé comme il est montré dans le tableau 04 :

Domaine	<i>Eubacteria</i>
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach

**Tableau 04** : Position systématique de *Staphylococcus aureus* (BELKACEMI et KASINI, 2010).

**II.3.1.3.3. Caractères principaux :**

Cocci à gram positif, immobile pigmenté à jaune, non sporulé, grouper en amas (grappes de raisin), G+C% : 30-39%, température optimal à 37°C, pH optimal : 7.2-7.4, NaCl 7.5%, anaérobie facultatif, oxydase(+), catalase(+), coagulase(+). (FAUCHERE et AVRIL, 2002; NAUCIEL et VILDE, 2005; DELARRAS, 2007).

**II.3.1.3.4. Pouvoir pathogène :**

Les manifestations pathogènes dues à *Staphylococcus aureus* sont très nombreuses, elles sont suppurations, nécrotiques ou entériques :

- ✓ Les suppurations localisées.
- ✓ Les septicémies et les endocardites.
- ✓ Les manifestations digestives.
- ✓ Le syndrome de choc toxique (FAUCHERE et AVRIL, 2002).

**II.3.1.3.5. Sensibilité aux antibiotiques :**

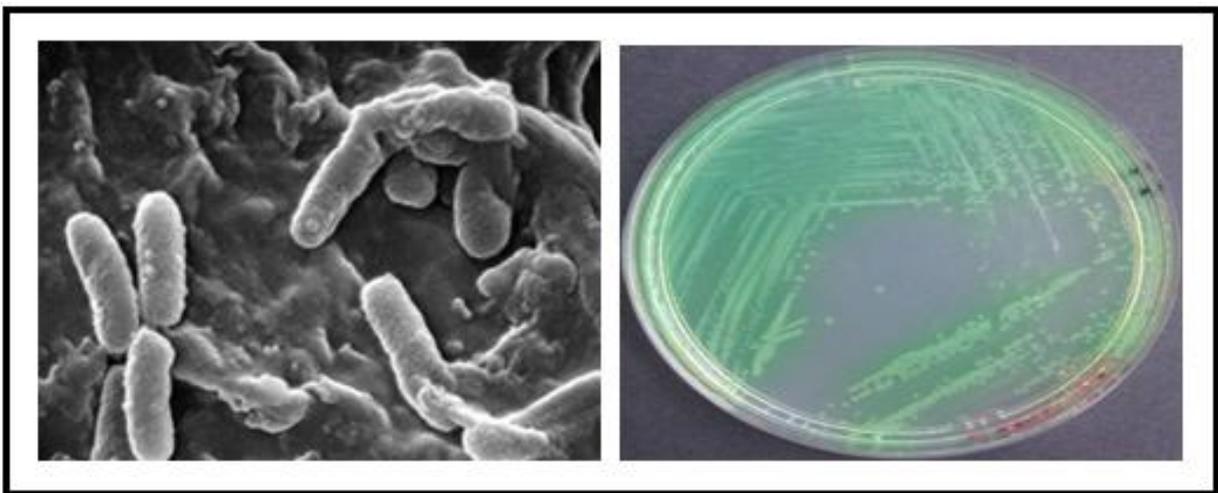
Les souches communaires sont généralement résistants aux pénicillines G et A, mais sensibles aux pénicillines M. Elles sont souvent sensibles aux macrolides, aux synergistines,

aux fluoroquinolones. Les *Staphylococcus aureus* développent rapidement des résistances aux antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glycopeptides (NAUCIEL et VILDE, 2005).

#### II.3.1.4. *Pseudomonas aeruginosa* :

##### II.3.1.4.1. Habitat :

C'est une bactérie rependue dans la nature (Photo 05). Il vit dans l'eau et le sol, on le trouve aussi dans l'environnement hospitalier, surtout dans les endroits humides : siphons de lavabos, savons liquide, humidificateur, solutions d'antiseptiques (chlorhexidine chlorure de benzalkonium, cétrimide notamment). *Pseudomonas aeruginosa* fait partie de la flore de transit de l'homme, on le trouve dans le tube digestif et plus rarement dans la salive (FAUCHERE et AVRIL, 2002).



**Photo 05** : *Pseudomonas aeruginosa* ([www.geniebio.ac-aix-marseille.fr](http://www.geniebio.ac-aix-marseille.fr))

##### II.3.1.4.2. Classification :

*Pseudomonas aeruginosa* est classé comme il est montré dans le tableau 04 : (DELARRAS, 2007).

Domaine	<i>Eubacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

**Tableau 05** : La systématique de *Pseudomonas aeruginosa*.

**II.3.1.4.3. Caractères principaux :**

Bacille gram négatif mobile à ciliature polaire monotriche, caractérisé par pigmentation bleu, vert, sporule, température optimal : 30 à 40°C, pH optimal 6.5-8, aérobic strict, chimo-organotrophe, oxydase(+), gaz(-), LDC(-), ODC(-), ADH(+), gélatine(+), psychrotrophe (FAUCHERE et AVRIL, 2002; NAUCIEL et VILDE, 2005; DELARRAS, 2007).

**II.3.1.4.4. Pouvoir pathogène :**

La bactérie peut provoquer des infections parfois sévères chez les sujets dont les défenses sont amoindries. Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques (NAUCIEL et VILDE, 2005). Responsable d'infection cutanées (impétigo, furoncle...), d'infection de la sphère ORL (sinusites, otites....) et d'infection divers (BELKACEMI et KASINI, 2010).

**II.3.1.4.5. Sensibilité aux antibiotiques :**

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie généralement multirésistante, les antibiotiques pouvant avoir une bonne activité sont ; la ticarcilline, la pipéracilline, l'azolocilline, la ceftazidime, la cefusulodime, le cefépime, l'imipénème et les aminosides.

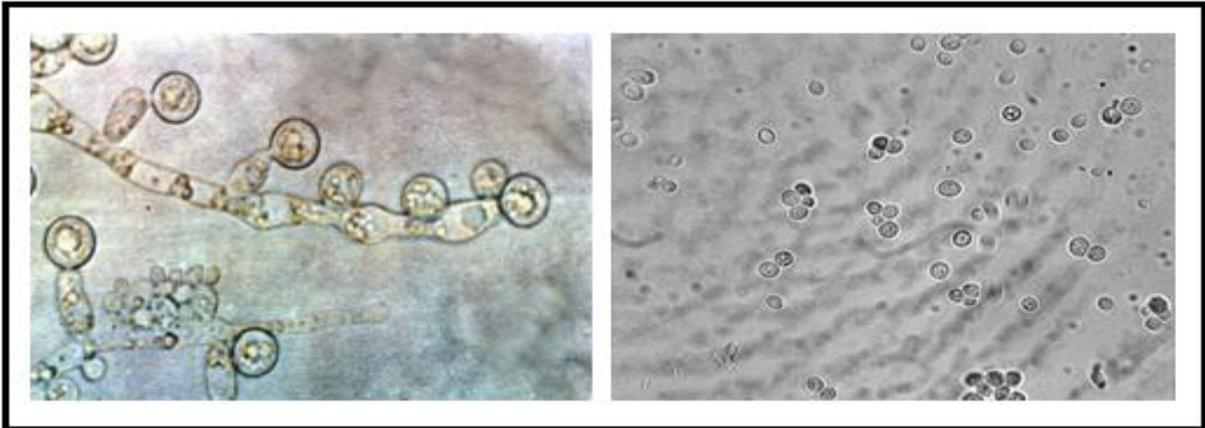
Les souches résistantes à la colistine sont très rares. La ciprofloxacine est la plus active des quinolones. L'activité de tous ces antibiotiques n'est pas régulière et doit toujours être précisée par antibiogramme (FAUCHERE et AVRIL, 2002).

## II.3.2 Levure :

### II.3.2.1. *Candida albicans* :

#### II.3.2.1.1. Habitat :

C'est un organisme vivant à l'état normal dans la bouche, le vagin et le tube digestif de l'être humain (Photo 06) (TONY et PAUL, 1997).



**Photo 06** : *candida albicans* ( <http://medkaau.com> )

#### II.3.2.1.2. Classification :

Domaine	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
Famille	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genre	<i>Candida</i>
Espèce	<i>Candida albicans</i> Berkhout

**Tableau 06** : Position systématique de *Candida albicans* (DELARRAS, 2007).

#### II.3.2.1.3. Caractères principaux :

*Candida albicans* est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue. Au laboratoire médical, la culture en boîte de pétri donne des colonies qui sont grandes, ronde, de

couleur blanche ou crème, elles poussent bien sur milieu de sabouraud ou sur gélose au sang (CHAKOU et BASSOU, 2005).

#### **II.3.2.1.4. Pouvoir pathogène :**

*Candidose* : le principal agent pathogène est *Candida albicans* responsable d'infections superficielles aussi bien systémique. Ces dernières ne sont souvent que chez des individus immunodéprimés. Il fait partie de la flore normale de l'intestin, les infections superficielles comprennent le muguet (sur la muqueuse buccal), des vulvo-vaginites. La pathogénicité de *Candida albicans* est liée à la phase de filamenteuse. Cette levure peut provoquer des infections du vagin, de la bouche ou de poumons (TONY et PAUL, 1997).

*Mycoses systémiques* : la plupart de ces infections résultent de spores, bien que *Candida albicans* provient plutôt du tube digestif ou de dispositifs intra vasculaire (TONY et PAUL, 1997).

#### **II.3.2.1.5. Sensibilité aux antibiotiques :**

*Candida* pathogène sont devenues résistantes à tous les antifongiques actuellement utilisés.

## II.4. Matériels utilisés au laboratoire :

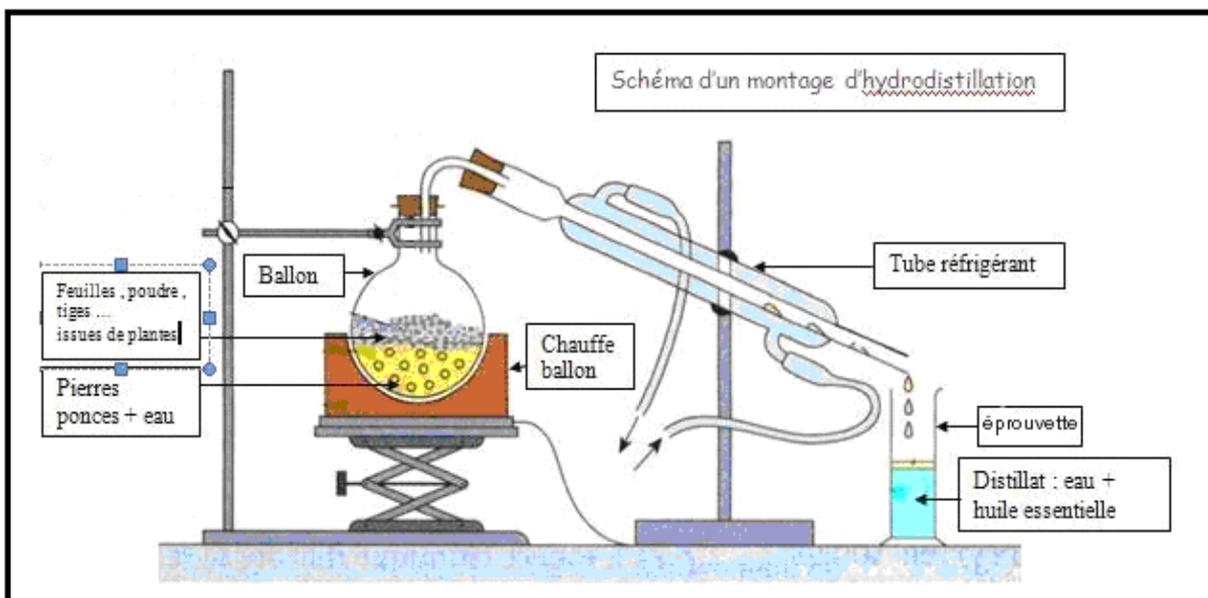
Afin de réaliser cette étude, plusieurs types d'appareillages ont été utilisés citant par exemple. Les matériels utilisés lors de l'extraction (figure 30), une ampoule à décanter, Becher, le sulfate de sodium, Erlenmeyer... etc. Et les matériels pour les manipulations des microorganismes tel que : Four pasteur, Bec Bunsen, Etuve, Boîte de pétri, Autoclave, Anse de platine, Pipettes pasteur, Bain-marie, Balance, Verre de montre, Papier filtre, Disques d'absorbance et des milieux de culture : Mueller Hinton, gélose nutritive.

## II.5. Les Méthodes :

### II.5.1. Procédé d'extraction :

Les huiles essentielles sont extraites par la méthode d'hydrodistillation. 100 g de *Peganum harmala l* sèche sont introduits dans un ballon de 1 litre imprégnés d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 1.5 à 2 heures. Les vapeurs chargées de substances volatiles traversent le réfrigérant se condensent puis elles sont récupérées dans une ampoule à décanter, l'eau et les huiles essentielles se séparent par différence de densité. Cette manipulation est répétée 7 fois.

Les huiles essentielles extraites sont conservées à une température voisine de  $6 \pm 1^\circ\text{C}$ , dans des flacons en verre opaque, fermés hermétiquement pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de température qui sont des principaux agents de dégradation. Une huile altérée perd son activité biologique (KHENAKA, 2011).



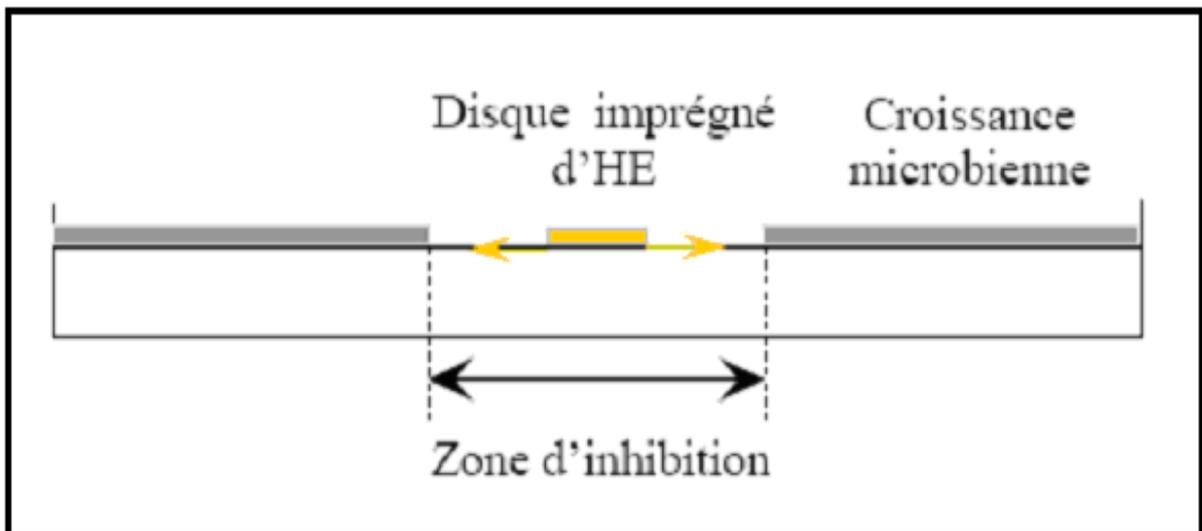
**Figure 30 :** Montage d'hydrodistillation utilisé dans l'extraction des huiles essentielles (KHENAKA, 2011).

### II.5.2.méthode de diffusion sur milieu solide :

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HEs de *P. Harmala*, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose: appelée aromatogramme. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques (BENJELALI et *al.*, 1986).

#### II.5.2.1 Principe :

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (Figure: 31).



**Figure 31 :** Principe de la lecture d'un antibiogramme (HELLEL, 2011).

**II.5.2.2. Suivi de l'activité des huiles essentielles :****II.5.2.2.1. Préparation du milieu :**

Les milieux de culture sont fondus les milieux au bain-marie à 80°C, ensuite sont coulés aseptiquement dans les boites de Pétri pour formé des couches 6mm de diamètre puis, refroidis progressivement (Photo 07).



A) Fondre les milieux au bain-marie



B) Remplissage des boites Piétri

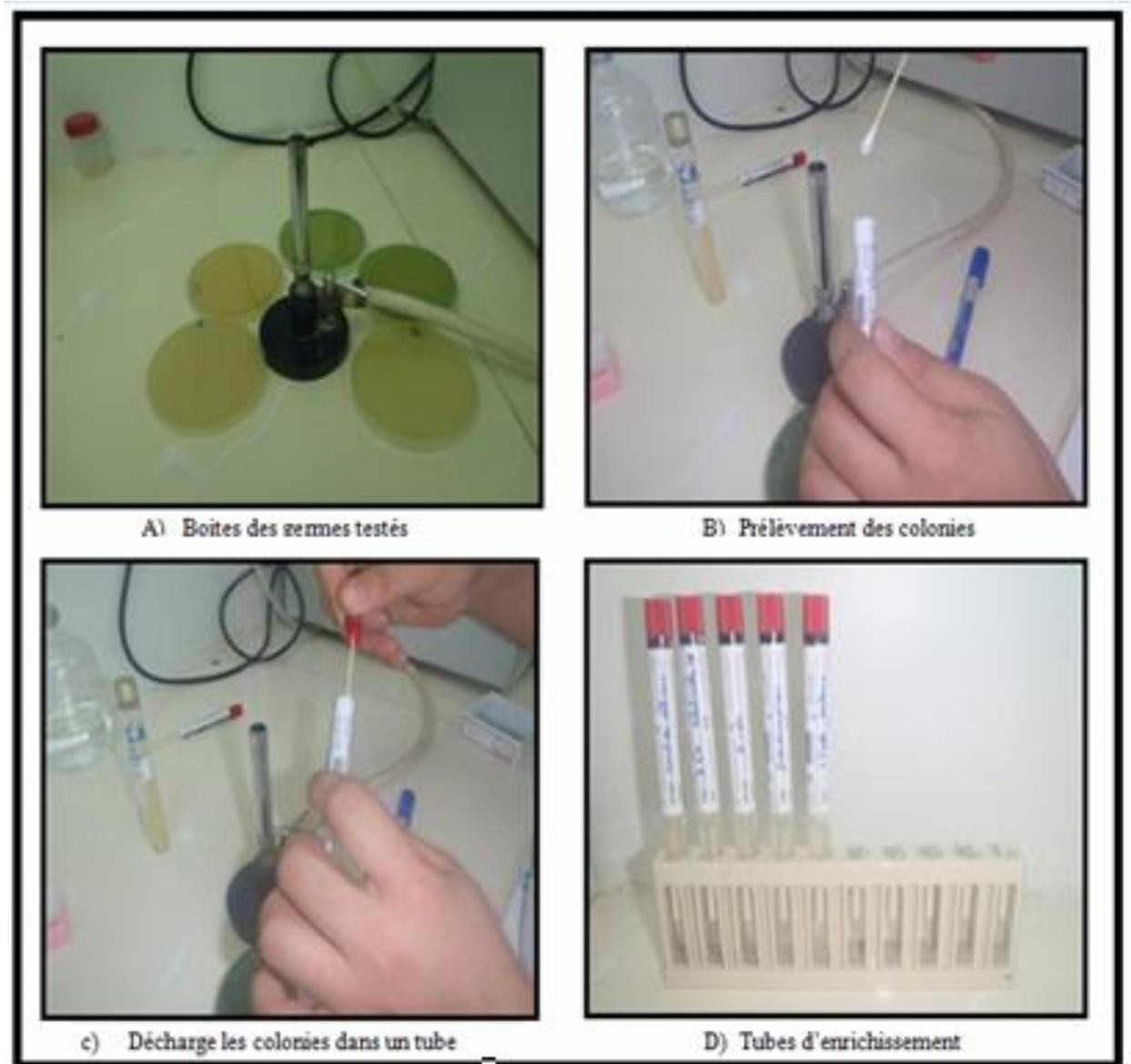


C) Refroidissement de milieu de culture

**Photo 07 : Etapes de préparation de culture.**

**II.5.2.2. Préparation de l'inoculum :**

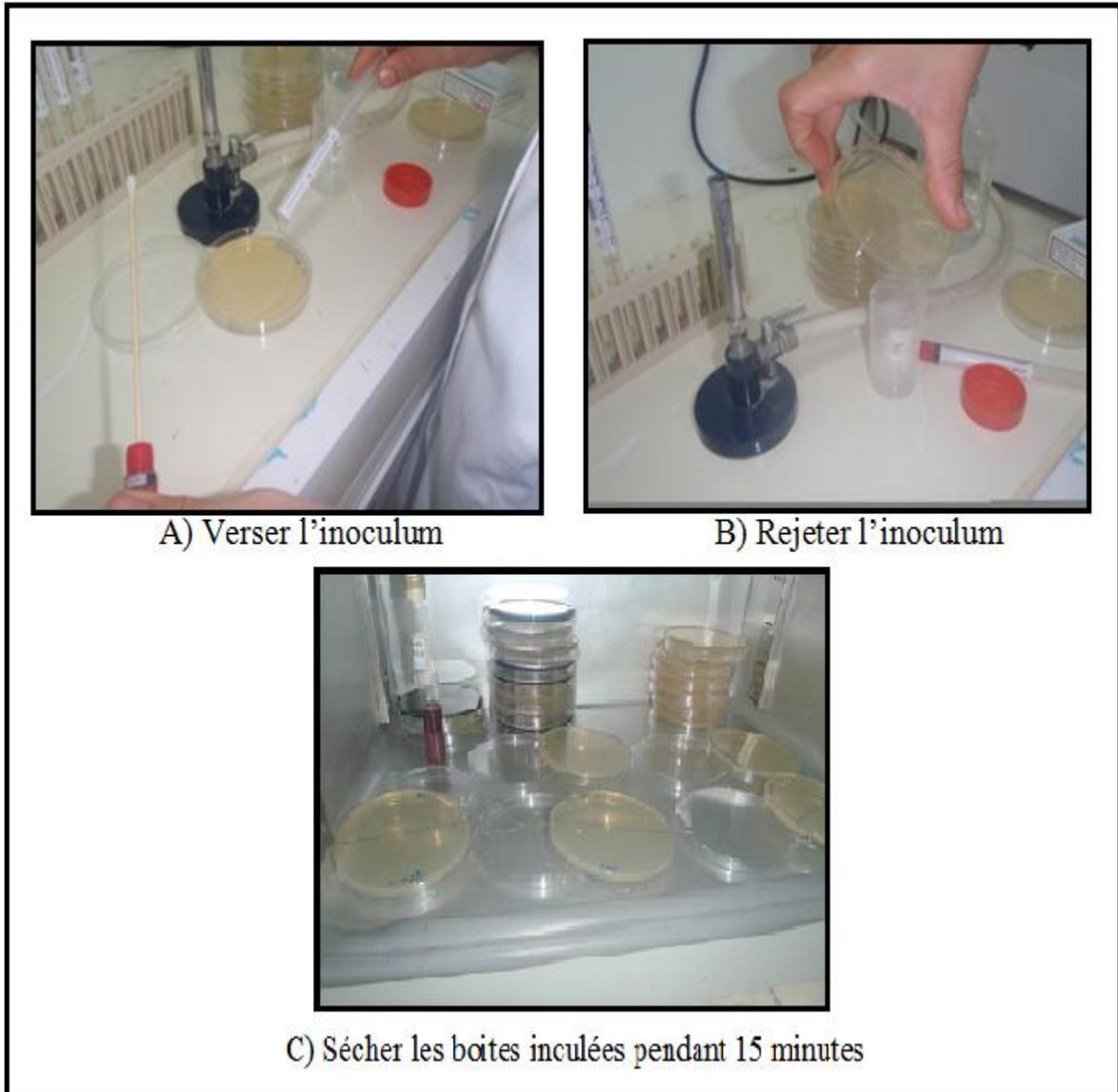
A partir d'une culture jeune, on prélève à l'aide d'une anse de platine deux à trois colonies pures et bien isolées qu'on décharge dans un tube contenant 5ml d'eau physiologique stérile. L'enrichissement dure pendant 2 à 3 heures (Photo 08).



**Photo 08 :** Etapes de préparation de l'inoculum.

**II.5.2.2.3 Ensemencement :**

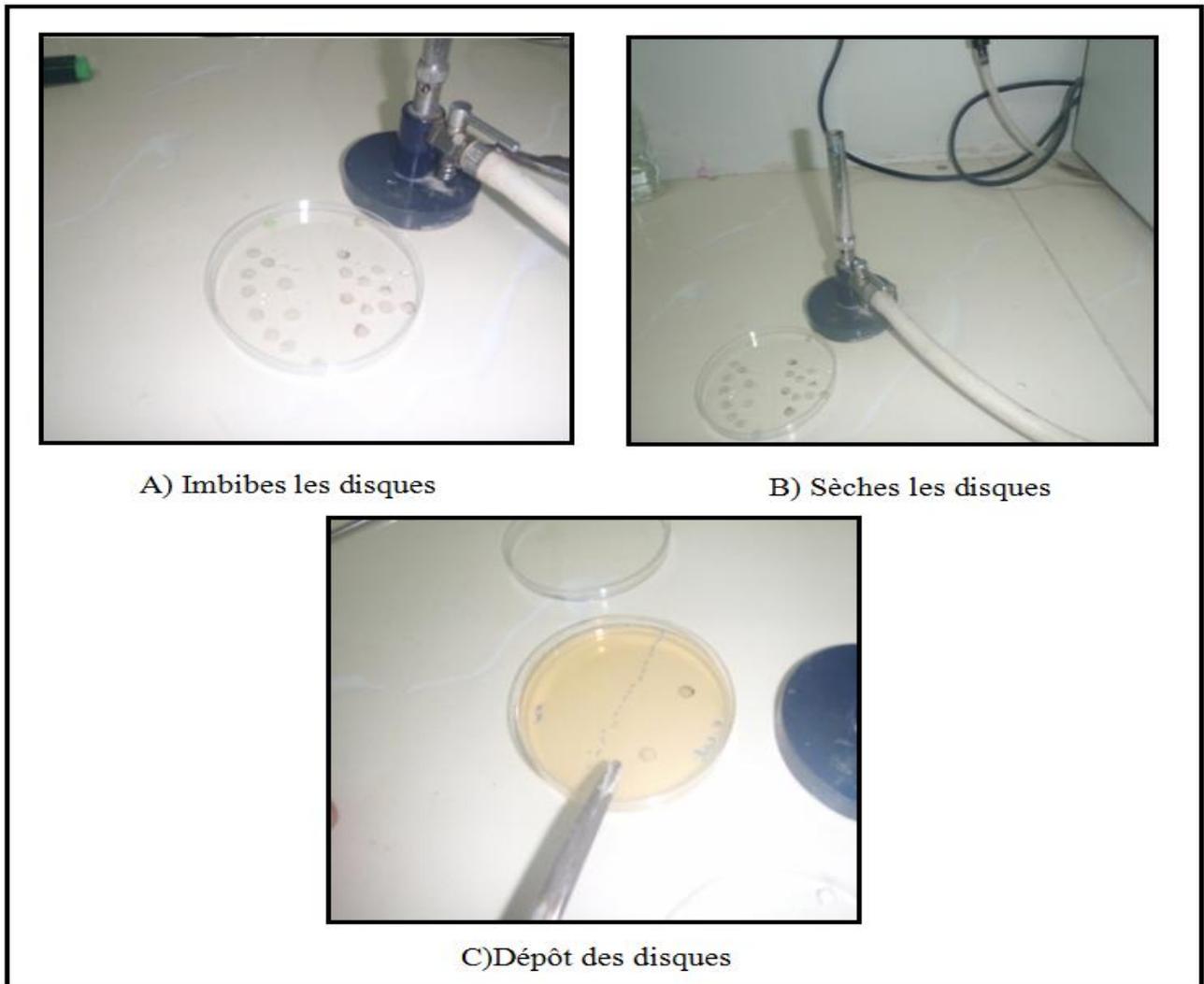
Sur des boîtes contenant le milieu gélosé Mueller Hinton d'une épaisseur de 4mm bien séchées, on introduit 3 à 5 ml de l'inoculum. On obtient ainsi, un étalement uniforme en nappe. L'excès du liquide est aspiré à l'aide d'une pipette pasteur et rejeté dans un bac d'eau de javel et les boîtes sont mises a sécher pendant 15 minutes (Photo 09).



**Photo 09 :** Etapes d'ensemencement.

#### II.5.2.2.4 Dépôt des disques :

Les disques sont prélevés à l'aide d'une pince stérile, puis imbibés avec les huiles essentielles de *Peganum Harmala l* jusqu'à imprégnation total du disque, puis séchés pour faire évaporer le solvant. Les disques ainsi traités sont déposés sur la surface de la gélose inoculée et laissés diffusés, puis incubés à 37°C à l'étuve pendant 24 heures pour les bactéries et 48 pour les levures (Photo 10).



**Photo 10** : Etapes de préparation et de dépôt des disques

#### II.5.2.2.5 Lecture :

Elle s'effectue par la mesure des diamètres d'inhibition d'ou :

- Diamètre <5mm : absence d'activité.
- Diamètre entre 5 et 10 mm : activité faible.
- Diamètre entre 10 et 16 mm : activité moyenne.
- Diamètre  $\geq$ 16 mm : activité très forte.