

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Abou-Baker Belkaid -Tlemcen-

Faculté des sciences de la Nature et de la Vie

et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie



MEMOIRE

En vue de l'obtention du **diplôme de MASTER**

En : Biologie

Spécialité : Microbiologie fondamentale

Thème

**Evaluation des activités biologiques
des extraits d'une plante médicinale
« *Peganum harmala* L. »**

Présenté par :

ZERHOUNI Chaimaà

TALEB Fethiya

Soutenue le : 23-06-2026, devant le jury composé de :

Président	BOUALI Waffa	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur	ZENATI Fatima	MCB	Université de Tlemcen
Encadrant	ZERHOUNI Khadidja	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2025-2026

Remerciement

Nous remercions tout d'abord Allah, le Tout-Puissant, de nous avoir accordé la santé, la force et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce travail.

*Nous exprimons notre profonde gratitude à notre encadrant, Mme **ZERHOUNI Khadidja** Maître de conférences classe B, pour sa disponibilité, ses conseils précieux et son accompagnement tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à Mme **BOUALI Waffa**, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de ce travail.*

*Nous remercions également Mme **ZENATI Fatima**, Maître de conférences classe B à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen pour le temps consacré à examiner ce travail ainsi que pour l'intérêt qu'elle lui a porté.*

Nous remercions enfin l'ensemble de nos enseignants pour la qualité de la formation et les connaissances qu'ils nous ont transmises tout au long de notre parcours universitaire.

Nous n'oublions pas toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail et nous ont apporté leur soutien.

À toutes et à tous, nous adressons nos sincères remerciements.



Dédicace

وَكَانَ فَضْلُ اللَّهِ عَلَيْكَ عَظِيمًا

Je remercie **Allah**, le Tout-Puissant, pour Sa miséricorde, Ses bienfaits et la force qu’Il m’a accordée pour accomplir ce travail.

Je dédie ce travail

À ma très chère mère, **Djamila**, pour son amour inconditionnel, sa tendresse, ses prières et tous les sacrifices qu’elle a faits pour moi. Tu es ma plus grande force et mon refuge dans chaque moment de ma vie.

À mon cher père, **Mohammed**, pour son soutien constant, sa confiance et ses précieux conseils qui m’ont toujours encouragée à avancer et à persévérer.

À mes adorables sœurs, **Asmae**, **Zineb** et **Zahra**, pour leur affection, leur présence et leur soutien qui ont illuminé mon parcours.

À mes cher grand-père **Benali** et grand-mère **Baya**, pour leur amour, leur sagesse et leur prières qui m’ont toujours accompagnée et guidée

À ma chère tante **Nadjet**, pour son affection, sa générosité et son soutien précieux.

À toute ma famille, pour leur amour, leur confiance et leurs encouragements tout au long de mon parcours.

À mon chère binôme **Fethiya**, avec qui j’ai partagé ce travail, entre moments de difficulté, de stress, mais aussi de joie, de solidarité et de réussite. Merci pour ton sérieux, ton aide et cette belle complicité.

Avec toute ma gratitude et mon affection.

Chaimaa





Dédicace

وَكَانَ فَضْلُ اللَّهِ عَلَيْكَ عَظِيمًا

Avant toute chose, je rends grâce à **Allah**, Tout-Puissant, pour Sa grâce et Son soutien qui m'ont permis d'atteindre ce jour béni. À Lui seul revient toute ma gratitude.

Je dédie ce travail

À ma chère maman, **Ammara**, mon refuge et mon paradis sur terre. Celle qui a toujours rêvé de me voir accomplir ce parcours. Merci pour ton amour inconditionnel, tes sacrifices silencieux et ton soutien inlassable. Que Dieu te préserve et te comble de santé et de bonheur.

À mon cher papa, **Abderrahim**, Mon pilier, mon guide et ma plus grande fierté. Merci pour ta confiance sacrée, tes nobles principes et ton amour paternel. Je prie le Tout-Puissant de te guérir, de t'accorder une santé de fer et de prolonger ta vie à nos côtés.

À mon unique sœur, **Fatima**, mon cœur, mon âme et mon amie de toujours. Merci d'avoir tant œuvré pour mon bonheur et de m'avoir soutenue à chaque instant. Que Dieu préserve notre lien et nous garde unies à jamais.

À mes frères, **Reda** et **Rayane**, mes soutiens, ma force et mes protecteurs. Merci pour votre amour et vos encouragements constants qui m'ont donné la force d'avancer. Je suis bénie de vous avoir à mes côtés.

À ma chère amie d'enfance **Hanane**... mon âme sœur de toujours, avec qui chaque souvenir devient inoubliable.

À mon cher binôme, **Chaïmaa**, ma compagne de route dans cette belle aventure. Merci pour les efforts partagés, les éclats de rire, le soutien mutuel et les souvenirs précieux. Ce chemin a été plus beau à tes côtés.

Fethiya



الملخص

تُعد البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية من أبرز التحديات التي تواجه الصحة العامة على المستوى العالمي في الوقت الراهن. وفي ظل هذه الإشكالية، تُشكل النباتات الطبية مصدرًا واعدًا للمركبات الحيوية الفعالة التي يمكن أن تسهم في تطوير بدائل علاجية جديدة. وفي هذا السياق، تناولت الدراسة الحالية بذور نبات الحرمل (*Peganum harmala* L.)، بهدف تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات والمضادة لتكوين الأغشية الحيوية لمختلف المستخلصات المحضرة من بذور هذا النبات.

تم تحضير ثلاثة أنواع من المستخلصات، تمثلت في مستخلص هيدرو-ميثانولي محضر بطريقة النقع، ومستخلص هيدرو-إيثانولي محضر بالطريقة نفسها، بالإضافة إلى مستخلص هيدرو-إيثانولي محضر بطريقة الارتجاع (Reflux). وأظهرت النتائج أن المستخلص الهيدرو-ميثانولي حقق أعلى مردود استخلاص بلغ 21.66%، كما سجل أعلى محتوى من المركبات الفينولية الكلية بتركيز قدره 45.7 ملغ مكافئ حمض الغاليك لكل غرام من الوزن الجاف. وأوضحت دراسة النشاط المضاد للأكسدة أن المستخلصات الإيثانولية أظهرت قدرة متوسطة على تثبيط الجذور الحرة من نوع DPPH، حيث بلغت قيم IC_{50} حوالي 3.7 ملغ/مل، في حين أظهر المستخلص الميثانولي نشاطًا مضادًا للأكسدة أقل رغم احتوائه على نسبة أعلى من متعددات الفينول. وتشير هذه النتائج إلى أن القدرة المضادة للأكسدة لا تعتمد فقط على المحتوى الفينولي، بل قد تتأثر بعوامل ومركبات أخرى موجودة في المستخلصات. أما فيما يتعلق بالنشاط المضاد للميكروبات، فقد بينت النتائج وجود تباين في حساسية الكائنات الدقيقة المختبرة، مع فعالية أكبر عمومًا تجاه البكتيريا موجبة الغرام. وقد تميز المستخلص الهيدرو-ميثانولي بأفضل نشاط مضاد للميكروبات، خاصة ضد بعض السلالات التابعة لجنس *Bacillus*. كما أظهرت اختبارات النشاط المضاد للأغشية الحيوية قدرة مستخلصات *P. harmala* L. على تثبيط التصاق الخلايا البكتيرية وتقليل تكوين الأغشية الحيوية، التي تُعد من العوامل الأساسية المسؤولة عن استمرار العدوى الميكروبية وصعوبة القضاء عليها. وبصفة عامة، تؤكد النتائج المتحصل عليها الأهمية البيولوجية لبذور *P. harmala* L. وتبرز إمكاناتها كمصدر طبيعي لمركبات ذات نشاطات مضادة للأكسدة ومضادة للميكروبات ومضادة لتكوين الأغشية الحيوية. غير أن الأمر يستدعي إجراء دراسات إضافية لتحديد المركبات الفعالة المسؤولة عن هذه التأثيرات بدقة، وفهم آليات عملها على المستوى الجزيئي.

الكلمات المفتاحية : *Peganum harmala* L. ؛ الحرمل؛ المركبات الفينولية؛ النشاط المضاد للميكروبات؛ النشاط المضاد للأكسدة؛ النشاط المضاد للأغشية الحيوية؛ المستخلصات النباتية؛ التداوي بالنباتات.

Abstract

Antibiotic-resistant bacteria currently constitute a major challenge to global public health. In response to this issue, medicinal plants represent a promising source of bioactive compounds that may contribute to the development of new therapeutic alternatives. In this context, the present study focused on the seeds of *Peganum harmala* L. (Harmel). The main objective of this work was to evaluate the antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activities of different extracts obtained from the seeds of this plant.

Three types of extracts were prepared: a hydro-methanolic extract obtained by maceration, a hydro-ethanolic extract obtained by maceration, and a hydro-ethanolic extract obtained by reflux extraction. The results revealed that the hydro-methanolic extract exhibited the highest extraction yield (21.66%) as well as the highest total phenolic content (45.7 mg GAE/g dry weight). Assessment of antioxidant activity demonstrated that the ethanolic extracts possessed a moderate free radical scavenging capacity against DPPH, with IC₅₀ values close to 3.7 mg/mL, whereas the methanolic extract exhibited lower antioxidant activity despite its higher polyphenol content. This discrepancy suggests that factors other than phenolic content alone may influence the antioxidant potential of the extracts. Regarding antimicrobial activity, the results highlighted a variable susceptibility among the tested microorganisms, with generally greater efficacy against Gram-positive bacteria. The hydro-methanolic extract displayed the most pronounced antimicrobial activity, particularly against certain strains belonging to the genus *Bacillus*. The antibiofilm assays further demonstrated the ability of *P. harmala* L. extracts to inhibit bacterial adhesion and reduce biofilm formation, which are key factors involved in the persistence of microbial infections. Overall, the findings confirm the biological potential of *P. harmala* L. seeds and emphasize their value as a natural source of compounds exhibiting antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activities. Nevertheless, further investigations are required to identify the bioactive constituents responsible for these effects and to elucidate their underlying mechanisms of action.

Keywords: *Peganum harmala* L.; Harmel; phenolic compounds; antimicrobial activity; antioxidant activity; antibiofilm activity; plant extracts; phytotherapy.

Résumé

Les bactéries résistantes aux antibiotiques représentent aujourd'hui un défi majeur pour la santé publique mondiale. Face à cette problématique, les plantes médicinales constituent une source prometteuse de composés bioactifs pouvant contribuer au développement de nouvelles alternatives thérapeutiques. Dans ce contexte, la présente étude s'est intéressée aux graines de *Peganum harmala* L. (Harmel). L'objectif principal de ce travail était d'évaluer les activités, antioxydante, antimicrobienne et antibiofilm de différents extraits obtenus à partir des graines de cette plante.

Trois types d'extraits ont été préparés : un extrait hydro-méthanolique obtenu par macération, un extrait hydro-éthanolique obtenu par macération et un extrait hydro-éthanolique obtenu par reflux. Les résultats ont montré que l'extrait hydro-méthanolique présentait le rendement d'extraction le plus élevé (21,66 %) ainsi que la plus forte teneur en composés phénoliques totaux (45,7 mg EAG/g de matière sèche). L'évaluation de l'activité antioxydante a révélé que les extraits éthanoliques possédaient une capacité modérée à neutraliser le radical libre DPPH, avec des valeurs d'IC₅₀ proches de 3,7 mg/mL, tandis que l'extrait méthanolique a présenté une activité plus faible malgré sa richesse en polyphénols. Cette différence suggère que d'autres facteurs que la seule teneur phénolique peut influencer le pouvoir antioxydant des extraits. Concernant l'activité antimicrobienne, les résultats ont mis en évidence une sensibilité variable des microorganismes testés, avec une efficacité généralement plus marquée contre les bactéries à Gram positif. L'extrait hydro-méthanolique s'est distingué par les meilleures performances antimicrobiennes, notamment vis-à-vis de certaines souches du genre *Bacillus*. Les essais relatifs à l'activité antibiofilm ont également démontré le potentiel des extraits de *P. harmala* L. à limiter l'adhésion bactérienne et à réduire la formation des biofilms, structures impliquées dans la persistance des infections microbiennes. Dans l'ensemble, les résultats obtenus confirment l'intérêt biologique des graines de *P. harmala* L. et soulignent leur potentiel comme source naturelle de molécules à activité antioxydante, antimicrobienne et antibiofilm. Des investigations complémentaires restent toutefois nécessaires afin d'identifier précisément les composés responsables de ces effets et de mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

Mots-clés: *Peganum harmala* L., Harmel, composés phénoliques, activité antimicrobienne, activité antioxydante, biofilm, extraits végétaux, phytothérapie.

Table des matières

المُلخَص.....	I
Abstract.....	II
Résumé.....	III
Introduction générale.....	1
1. Introduction générale	2
Matériel et méthodes.....	10
2. Matériel et méthodes.....	11
2.1 Origine et préparation des échantillons.....	11
2.1.1 Matériel végétal.....	11
2.1.2 Préparation de l'échantillon	11
2.2 Extraction des composés bioactifs	11
2.2.1 Extraction par macération hydro-méthanolique (MeOH)	12
2.2.2 Extraction par macération hydro-éthanolique (EtOH)	13
2.2.3 Extraction hydro-éthanolique par reflux (EtOH par reflux).....	14
2.2.4 Calcul du rendement	15
2.3 Propriété fonctionnelle et phytochimique de produit formulé	15
2.3.1 Dosage des phénols totaux	15
2.4 Evaluation des activités biologiques	16
2.4.1 Activité antioxydante	16
2.4.2 Activité antimicrobienne.....	17
2.4.3 Activité antibiofilm des extraits de <i>Peganum harmala</i> L.	20
Résultat et discussions	23
3 Résultats et discussions.....	24
3.1 Rendements des extraits.....	24
3.2 Dosage des polyphénols totaux.....	26
3.3 Evaluation des activités biologiques	29
3.3.1 Activité antioxydante	29
3.3.2 Activité antimicrobienne.....	35
3.3.3 Activités antibiofilm de l'extrait de <i>Peganum harmala</i> L.	41
Conclusion générale	47

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification taxonomique de <i>P. harmala</i> L.	5
Tableau 2: Classification taxonomique de <i>P. harmala</i> L.	6
Tableau 3: Souches de référence utilisées dans l'étude.....	17
Tableau 4: Classification des souches selon leur capacité de formation de biofilm.....	21
Tableau 5: Rendements d'extraction et caractéristiques des extraits de <i>P. harmala</i> L.....	24
Tableau 6: Quantification des composés phénoliques des extraits des graines de <i>P. harmala</i> L. (extrait EtOH macéré, extrait EtOH sous reflux et extrait MeOH).....	26
Tableau 7: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations.	30
Tableau 8: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations.	31
Tableau 9: Valeur de l'IC ₅₀ de l'extrait EtOH sous reflux	32
Tableau 10: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations	33
Tableau 11: Valeur de l'IC ₅₀ de l'extrait EtOH macéré.....	34
Tableau 12: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance des souches microbienne testées.....	35
Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance de <i>C. albicans</i>	35
Tableau 14: Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits végétaux obtenus sur les souches microbiennes testées.....	39
Tableau 15: Valeurs de densité optique de la formation du biofilm des souches bactériennes non traitées.	41
Tableau 16: Classification des souches bactériennes selon leur capacité de formation de biofilm.	42
Tableau 17: Effet antibiofilm des extraits de <i>P. harmala</i> L. sur différentes souches bactériennes.	43
Tableau 18: Pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm par les extraits de <i>P. harmala</i> L.	44
Tableau 19: Effet antibiofilm des extraits de <i>P. harmala</i> L. sur des souches bactériennes.....	45

Liste des figures

Figure 1: Les fleurs et feuilles de la plante <i>Peganum harmala</i> L.	3
Figure 2: Les graines de la plante <i>P. harmala</i> L.	4
Figure 3: Les étapes de préparation de poudre des graines de <i>P. harmala</i> L.	11
Figure 4: Étapes du protocole d'extraction hydro-méthanolique de la poudre végétale de <i>P. harmala</i> L.	12
Figure 5: Procédure de purification et de séchage de l'extrait MeOH des graines de <i>P. harmala</i> L.	13
Figure 6: Les étapes de préparation de l'extrait EtOH sous reflux des graines de <i>P. harmala</i> L.	14
Figure 7: Préparation du test de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des trois extraits de <i>P. harmala</i> L.	19
Figure 8: Préparation de la microplaque pour le test de formation du biofilm.	20
Figure 9: Microplaque utilisée pour l'évaluation de l'activité antiadhérente.	22
Figure 10: Rendements des différents extraits de <i>P. harmala</i> L.	24
Figure 11: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	26
Figure 12: Teneurs en polyphénols totaux des extraits EtOH macéré, MeOH macéré et EtOH sous reflux obtenus à partir des graines de <i>P. harmala</i> L.	27
Figure 13: Courbe d'inhibition radicalaire du BHT en fonction de la concentration.	29
Figure 14: Courbe du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration.	30
Figure 15: Courbe du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration.	32
Figure 16: Courbe du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations pour le piégeage de radical DPPH.	33
Figure 17: Zones d'inhibition des extraits de <i>P. harmala</i> L. (EtOH, MeOH et extrait hydro-éthanolique obtenu sous reflux) et du CN10 sur les bactéries à Gram positif.	36
Figure 18: Zones d'inhibition des extraits de <i>P. harmala</i> L. (EtOH, MeOH et extrait hydro-éthanolique obtenu sous reflux) et du CN10 sur les bactéries à Gram négatif.	37
Figure 19: Zones d'inhibition des extraits de <i>P. harmala</i> L. (EtOH, MeOH et extrait hydro-éthanolique obtenu sous reflux) et du AMB 20 sur levure <i>candida albicans</i>	37
Figure 20: Effet des extraits de <i>P. harmala</i> L. sur la formation du biofilm chez les différentes souches bactériennes.	44

Liste des abréviations

µg/mL : microgramme par millilitre

AMB 20 : Amphotericine B (antifongique)

APG IV : Angiosperm Phylogeny Group IV (classification phylogénétique des plantes)

ATCC : American Type Culture Collection (souches de référence)

BN : Bouillon nutritif

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CN10 : Gentamicine (10 µg /disque)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (radical libre utilisé pour le test antioxydant)

EAG/g MS : milligramme équivalent acide gallique par gramme de matière sèche

EtOH : Éthanol

FC : Réactif de Folin-Ciocalteu

GN : Gélose nutritive

IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50 %

L. : Linné (autorité botanique)

MeOH : Méthanol

mg : milligramme

MH : Milieu Mueller-Hinton

MHB : bouillon Muller-Hinton

***P. harmala* L.** : *Peganum harmala* Linné

PI % : Pourcentage d'inhibition

TCP : Plaque de Culture de Tissus

UFC/mL : Unités formant colonie par millilitre



Introduction générale



1. Introduction générale

Depuis des millénaires, l'homme a eu recours sur les ressources naturelles et la médecine traditionnelle pour prévenir et traiter de nombreuses maladies. Les plantes médicinales forment un socle solide de la pharmacopée moderne. Cependant, malgré les progrès considérables réalisés dans le domaine médical et la découverte des antibiotiques, l'efficacité de ces traitements est aujourd'hui menacée par l'apparition et la propagation de bactéries résistantes. Cette résistance bactérienne réduit les possibilités thérapeutiques disponibles et augmente les risques de complications. Face à cette situation préoccupante, la recherche de nouvelles substances antimicrobiennes, notamment à partir de sources naturelles telles que les plantes médicinales, constitue une voie prometteuse pour lutter contre les infections bactériennes et répondre à ce défi majeur de santé publique à l'échelle mondiale (**Iserin, 2001**).

Parmi les nombreuses espèces médicinales qui existent en Algérie, il y en a quelques-unes qui attirent vraiment l'attention, surtout parce qu'elles sont riches en métabolites secondaires, et aussi avec des propriétés biologiques qui s'avèrent multiples. Parmi celles-ci, *Peganum harmala* L., qu'on nomme souvent « Harmel », prend une place non négligeable dans la médecine traditionnelle (**Dehiri et al., 2022**). Cette espèce a suscité un intérêt croissant en raison des nombreuses activités pharmacologiques qui lui ont été attribuées dans la littérature scientifique (**Bournine et al., 2017**), et renferme de nombreux métabolites secondaires biologiquement actifs qui lui confèrent un large spectre d'activités thérapeutiques, des travaux antérieurs ont notamment mis en évidence ses effets antidiabétiques et antitumoraux, ainsi que ses activités antibactériennes, antifongiques et antivirales, soulignant ainsi son potentiel dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques (**Asgarpanah & Ramezanloo, 2012**).

Le nom du genre *Peganum* provient du grec, tandis que l'épithète spécifique *harmala* dériverait du nom de la ville libanaise Harmel (**Harchaoui, 2019**). Connue sous le nom commun « Harmel » (**Lavergne, 2013**). Le nom scientifique complet est *Peganum harmala* Linn. (**Lamchouri et al., 2000**). Elle est également désignée par divers noms vernaculaires : Rue de Syrie, Rue sauvage, Rue verte ou encore Pégane. En arabe, elle porte plusieurs appellations régionales, parmi lesquelles alqat al-dib, harjal, harmal, hremilan, huraymilan, legharma, mogannanna, sadab-sami et sadab-bari (**Dahel & Messaoudi, 2019**).

P.harmala L. est une plante vivace, herbacée, glabre et fortement ramifiée, pouvant atteindre 30 à 60 cm de hauteur. Sa période de floraison, dans l'hémisphère Nord, s'étend de juin à août (**Yousefi et al., 2009**).

Les tiges de cette plante sont dressées et fortement ramifiées. Elles disparaissent durant l'hiver (**Figure1**). Les feuilles sont alternes, allongées et franchement divisées en segments fins, un peu irréguliers, ce qui donne un aspect très découpé au limbe. Celui-ci peut aller jusqu'à environ 5×5 cm, mais la zone au-dessus des segments reste très étroite, ne dépassant pas 1,5 mm de largeur. A l'extrémité des tiges, se forment des fleurs solitaires assez grandes, mesurant autour de 25 à 30 mm (**Quézel & Santa, 1963**). Les fleurs sont relativement grandes, de couleur blanc jaunâtre avec des nervures vertes. Elles possèdent cinq sépales inégaux et persistants. Les pétales sont de couleur crème et peuvent présenter une légère teinte rose orangé accompagnée des nervures jaunes. On observe entre dix et quinze étamines, avec des anthères d'environ 8 mm de long et des filets larges et aplatis. Le pistil mesure entre 8 et 9 mm. L'ovaire est sphérique, formé de trois à quatre loges, et le stigmate présente trois carènes (**Maire, 1933; Chopra et al., 1960; Ozenda, 1991**).



Figure 1: Les fleurs et feuilles de la plante *Peganum harmala* L. (**Weckesser, 2013**).

Les graines de *P. harmala* L. sont de couleur brun foncé, de petite taille et présentent une forme subtriangulaire, avec des dimensions d'environ 3 à 4 mm × 2 mm (**Tahri et al., 2004**). La récolte s'effectue principalement en été, lorsque les capsules arrivent à maturité. Celles-ci renferment un pigment rougeâtre connu sous le nom de Turkey red (**Iserin, 2001**) (**Figure 2**).



Figure 2: Les graines de la plante *P. harmala* L. (**Auteur, 2026**) (image personnel).

La racine est longue et relativement dure, avec beaucoup de fibres autour. Elle s'enfoncer très profondément dans le sol, parfois jusqu'à plus de 3 mètres. De plus, elle a la capacité de produire de nouvelles pousses à partir de ses racines secondaires.

Bien que cette espèce soit souvent rattachée à la famille des Zygophyllaceae (**Cronquist, 1981**), sa classification n'est pas totalement claire. Certains scientifiques ont suggéré de la classer dans une autre famille, les Nitrariaceae (**Sheahan & Chase, 1996**).

Selon **Sheahan & Chase (1996)**, la famille comprend environ 285 espèces, réparties en 5 sous-familles et 27 genres. Ces taxons sont largement distribués dans les milieux arides, semi-arides, salins et désertiques (**Tahrouch et al., 1998 ; Asgarpanah & Ramezanloo, 2012**).

Selon le système de **Cronquist (1981)**, *P. harmala* L. appartient à la famille des Zygophyllaceae (**Tableau 1**).

Tableau 1: Classification taxonomique de *P. harmala* L (**Cronquist, 1981**).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Sapindales
Famille	Zygophyllaceae
Genre	<i>Peganum</i>
Espèce	<i>Peganum harmala</i> L.

Concernant la classification des plantes, une évolution significative est observée dans l'approche taxonomique entre la classification de **Cronquist (1981)** et le système **APG IV (2016)**. En effet, la classification traditionnelle, repose essentiellement sur des critères morphologiques visibles, utilisés autrefois pour le regroupement des espèces végétales.

Avec le développement des techniques de biologie moléculaire et de la phylogénie, la classification des plantes a été progressivement révisée pour mieux rendre compte de leurs véritables relations et affinités évolutives. Cette transition a finalement conduit à la réorganisation de plusieurs groupes taxonomiques, notamment au niveau des familles.

La comparaison de ces deux systèmes permet ainsi de mettre en lumière la transformation d'un passage d'une classification traditionnelle fondée uniquement sur les données morphologiques à une classification moderne basée sur des données génétiques et une approche évolutive.

La classification selon le système **(APG IV, 2016)** est présentée dans le **tableau 2**.

Tableau 2: Classification taxonomique de *P. harmala* L. selon **(APG IV, 2016)**.

Règne	Plantae
Clade	Angiospermes
Clade	Eudicotylédones (Eudicots)
Clade	Rosidées (Rosids)
Ordre	Sapindales
Famille	Nitrariaceae
Genre	<i>Peganum</i>
Espèce	<i>Peganum harmala</i> L

P. harmala L., est une plante qui possède un large éventail d'activités pharmacologiques. Des études ont montré des propriétés antibactériennes et antifongiques **(Nenaah, 2010)**. Elle présente aussi des effets antispasmodiques, antihistaminiques et vasorelaxants ce qui pourrait justifier son usage pour le soulagement de certains troubles musculaires et circulatoires **(Asghari & Lockwood, 2002)**. D'autres recherches ont montré son potentiel anticancéreux ainsi que ses activités antitumorales et antivirales **(Bellakhdar, 1997)**. En plus, cette plante se distingue par sa propriété antioxydants ainsi que des effets hypoglycémians, hépatoprotecteurs, antinociceptifs et anti-inflammatoires **(Asgarpanah & Ramezanloo, 2012)**. Sur le plan thérapeutique, *P. harmala* L. est utilisé comme agent antiseptique et intervient dans le traitement de plusieurs pathologies, notamment l'hypertension, les maladies cardiaques et certains troubles du système nerveux tels que la maladie de Parkinson **(El-Bakatoushi & Ahmed, 2018)**. Elle est également employée comme analgésique et dans le traitement de certaines affections oculaires **(Shahverdi et al., 2005)**.

Depuis l'Antiquité, cette plante occupe une place importante dans la médecine traditionnelle où elle sert à soigner de nombreuses maladies (Li, 2024). Par exemple elle est utilisée comme remède contre le diabète (Bnouham et al., 2002). Elle a aussi été utilisée pour traiter des problèmes psychiatriques comme la nervosité (Kartal et al., 2003). Les graines de *P. harmala* L. sont très intéressantes sur le plan médical. Elles possèdent des propriétés anesthésiques, antispasmodiques et antihelminthiques parfois utilisées dans le traitement des rhumatismes et de l'asthme (Bellakhdar, 1997). En ce qui concerne les modes d'utilisation, La plante est utilisée soit à l'état frais, soit après broyage pour réaliser des cataplasmes appliqués localement. Elle peut également être pressée afin d'en extraire le suc, lequel sert à préparer un liniment à base de graisse de mouton, tandis que la fumigation peut être réalisée à partir de la plante sèche ou de ses graines (Hammiche et al., 2013).

Dans la médecine traditionnelle locale, elle est parfois transformée en pommade pour traiter la fièvre ou utilisée en friction pour soulager les douleurs rhumatismales (Kemassi et al., 2014). Enfin, en dehors de ses usages médicaux, *P. harmala* L. présente un intérêt artisanal. Le colorant rouge extrait de ses graines est utilisé en Turquie et en Iran pour la teinture des tapis (Baytop, 1999).

P. harmala L. est particulièrement riche en molécules bioactives présentant un large éventail d'applications dans les domaines industriels, alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Parmi ces composés, on retrouve notamment les alcaloïdes, flavonoïdes, coumarines, terpènes, acides phénoliques et tanins (El-Ghorab et al., 2010 ; Li, 2024). Les alcaloïdes constituent l'un des groupes majeurs de métabolites secondaires de la plante, en raison de leur diversité structurale et de leurs activités biologiques. Les principaux alcaloïdes présents dans les graines sont l'harmaline, l'harminine et l'harmalol, connus pour leurs propriétés analgésiques, diurétiques, anthelminthiques, antiprolifératives, abortives, antimicrobiennes (Tahrouch et al., 2002), ainsi que des propriétés antispasmodiques et antipyrétiques (Chopra et al., 1958). Certains de ces composés présentent également des effets hallucinogènes (O'Hearn & Molliver, 1993).

La teneur totale en alcaloïdes dans les graines est estimée entre 2 % et 7,7 % (Li et al., 2017). La répartition quantitative varie selon le composé : l'harminine et l'harmaline présentent les concentrations les plus élevées, respectivement 4,3 % et 5,6 %, suivies de l'harmalol (0,6 %) et de la tétrahydroharminine (0,1 %) (Herraiz et al., 2010).

La présence de composés chimiques tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes et autres métabolites secondaires suggère un potentiel biologique important. Ainsi, il est essentiel

d'étudier l'activité biologique associée à ces composés. Parmi ces activités figure l'activité antibactérienne. Les alcaloïdes β -carbolines présents dans les graines ont démontré une activité antibactérienne notable contre plusieurs souches pathogènes, notamment *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pasteurella multocida* et *Bacillus subtilis* (**Kaya, 2023**). De plus, un antibiotique dérivé de *P. harmala* L. a été proposé pour le traitement d'infections causées par *K. pneumoniae* (**Fazal et al., 2012**), soulignant le potentiel thérapeutique de cette plante dans la lutte contre les bactéries résistantes. Par ailleurs, l'utilisation de la fumée issue de la combustion des graines de *P. harmala* L. a été étudiée comme méthode de désinfection de l'air. Une exposition de 10 minutes à la fumée produite par 10 g de graines a permis de réduire la concentration bactérienne aérienne de 92,8 % (**Arshad et al., 2008**). L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de graines de *P. harmala* L. a été réalisée à travers la détermination de la teneur en phénols totaux et la mesure de l'activité de piégeage du radical DPPH. Les extraits aqueux, hydroalcooliques et éthanoliques ont révélé une forte activité antioxydante, attribuée à la richesse en composés phénoliques (**Kaskoos, 2014**) et à leur capacité à neutraliser les radicaux libres (**Abbas et al., 2021**). Par ailleurs, une étude a isolé une protéine de 132 kDa à partir des graines de *P. harmala* L., dont l'effet protecteur contre le stress oxydatif induit par le tétrachlorure de carbone a été démontré chez le rat. Cette protéine a présenté une activité antioxydante comparable à celle de l'albumine sérique bovine (BSA) et de la vitamine C (**Soliman et al., 2013**), soulignant le potentiel thérapeutique de la plante au-delà de ses composés phénoliques. En complément de cette activité, une activité antibiofilm a également été mise en évidence par **Khadraoui et al. (2022)**, leur étude a montré que les extraits de graines de *P. harmala* L. présentent une activité antibiofilm significative en inhibant la formation de biofilms chez *P. aeruginosa* multirésistantes, ce qui met en évidence le potentiel de cette plante dans la lutte contre les infections bactériennes persistantes.

Ce travail a pour objectif d'évaluer les activités antimicrobienne, antioxydante et antibiofilm des extraits de graines de *P. harmala* L., afin de mettre en évidence leur potentiel biologique.

Ce mémoire est structuré en quatre parties principales. La première section est consacrée à une introduction générale portant sur les caractéristiques botaniques et phytopharmacologiques des graines de *P. harmala* L. La deuxième partie porte sur le matériel et les méthodes, où sont détaillées les techniques de préparation des extraits, le matériel utilisé et les méthodes d'évaluation des activités biologiques des extraits de graines de *P. harmala* L. La troisième partie présente les résultats des tests biologiques réalisés, ainsi que leur discussion et interprétation. Enfin, la conclusion générale résume les résultats obtenus et propose des perspectives de recherche futures.



Matériel et méthodes



2. Matériel et méthodes

L'ensemble des manipulations a été réalisé au niveau de laboratoire de recherche antibiotiques, antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (LAPSAB), Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen.

2.1 Origine et préparation des échantillons

2.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des graines de *P. harmala* L. Ces graines ont été achetées au mois de mars 2026 chez un herboriste à Maghnia, dans la wilaya de Tlemcen, située dans la région de l'ouest de l'Algérie. Elles sont originaires de la wilaya de Tissemsilt.

2.1.2 Préparation de l'échantillon

Après acquisition, les graines ont été nettoyées afin d'éliminer les impuretés, puis séchées à l'air libre, à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Elles ont ensuite été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre fine, puis conservées dans des flacons hermétiques jusqu'à leur utilisation (**Figure 3**).



Figure 3: Les étapes de préparation de poudre des graines de *P. harmala* L. (image personnel).

2.2 Extraction des composés bioactifs

Les extraits des graines de *P. harmala* L. ont été obtenus par la méthode de macération, selon un protocole adapté de **Saada (2023)**, une méthode largement utilisée pour l'extraction des composés bioactifs.

Trois extraits ont été préparés : un extrait hydro-méthanolique par macération et deux extraits hydro-éthanoliques, obtenus par macération et par reflux.

2.2.1 Extraction par macération hydro-méthanolique (MeOH)

L'extraction a été réalisée par macération à froid à partir des graines de *P. harmala* L. Une quantité de 30 g de poudre végétale a été introduite dans un bécher puis mélangée avec 300 mL d'un solvant hydro-méthanolique (méthanol/eau distillée, 70:30, v/v).

Le mélange a été agité magnétiquement pendant 3 heures à température ambiante, sans chauffage. Il a ensuite été fermé hermétiquement et maintenu à l'abri de la lumière pendant 24 heures (**Figure 4**).

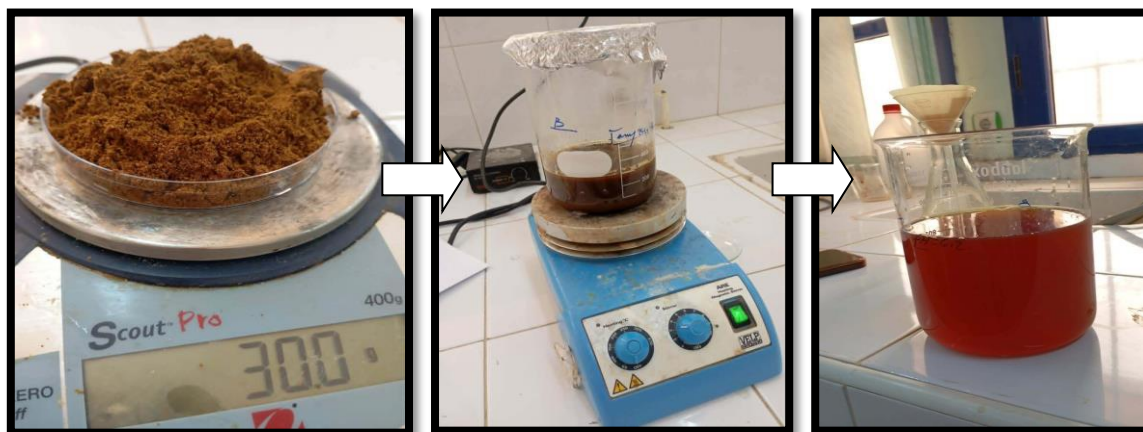


Figure 4: Étapes du protocole d'extraction hydro-méthanolique de la poudre végétale de *P. harmala* L. (image personnel).

Après cette période, le mélange a été filtré. Le résidu solide a été soumis à une nouvelle macération dans les mêmes conditions avec du solvant frais. Cette opération a été répétée pendant trois jours successifs afin d'optimiser le rendement d'extraction. Les filtrats obtenus ont été combinés pour constituer l'extrait final. Après extraction, les filtrats ont été versés dans des boîtes de Pétri en verre, puis placés dans une étuve réglée à 37 °C afin de permettre l'évaporation du solvant jusqu'à l'obtention d'un extrait sec (**Figure 5**).

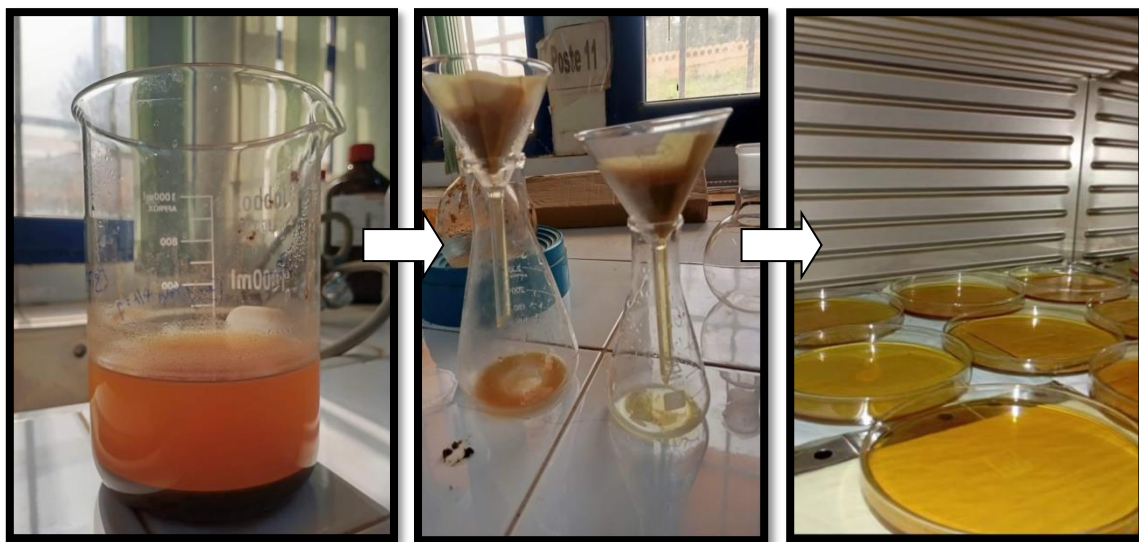


Figure 5: Procédure de purification et de séchage de l'extrait MeOH des graines de *P. harmala* L. (image personnel).

Après quatre jours de séchage, l'extrait sec a été récupéré par grattage, puis conservé dans des tubes Eppendorf hermétiquement fermés. Les extraits obtenus ont ensuite été utilisés pour l'évaluation de différentes activités biologiques

2.2.2 Extraction par macération hydro-éthanolique (EtOH)

L'extraction par macération hydro-éthanolique a été réalisée à partir des graines de *P. harmala* L. Une quantité de 30 g de poudre végétale a été mélangée à 300 mL d'un solvant (eau distillée/éthanol, 70:30, v/v). Le mélange a été soumis à une agitation magnétique, puis laissé en macération à température ambiante, à l'abri de la lumière, pendant 24 heures. Après la macération, le mélange a été filtré. Le filtrat obtenu a ensuite été concentré par évaporation du solvant dans des boîtes de Pétri en verre à 37 °C jusqu'à l'obtention d'un extrait sec. L'extrait a été récupéré par grattage puis conservé dans des tubes Eppendorf pour les analyses ultérieures.

2.2.3 Extraction hydro-éthanolique par reflux (EtOH par reflux)

L'extraction par reflux a été réalisée à partir des graines de *P. harmala* L. Une quantité de 30 g de poudre végétale a été mélangée avec un solvant hydro-éthanolique (eau distillée/éthanol, 70:30 v/v) dans un ballon muni d'un système de reflux, puis chauffée pendant 1 heure.

Après refroidissement, le mélange a été filtré. Le filtrat obtenu a ensuite été concentré par évaporation du solvant dans des boîtes de Pétri en verre placées à 37 °C jusqu'à obtention d'un extrait sec. L'extrait a été récupéré par grattage et conservé dans des tubes Eppendorf pour les analyses ultérieures (**Figure 6**).



Figure 6: Les étapes de préparation de l'extrait EtOH sous reflux des graines de *P. harmala* L. (image personnel).

2.2.4 Calcul du rendement

Le pourcentage en extrait sec a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{M}{M0} \times 100$$

R(%) : Rendement exprimé en %.

M : Masse en g de l'extrait sec.

M0 : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

2.3 Propriété fonctionnelle et phytochimique de produit formulé

2.3.1 Dosage des phénols totaux

Le réactif utilisé, le Folin-Ciocalteu, est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$), et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune. La méthode est basée sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleue qui absorbe à 750 nm. Ce dosage est effectué par la comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue (**Boizot et al., 2006**).

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerris et al. (2006)**: Une prise de 100 μ L de l'extrait (4mg/mL) est mélangée avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex. Après 5 minutes, 100 μ L du réactif de FC (1N) sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 30 min à la température ambiante et la lecture est effectuée par rapport à un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm.

Une gamme étalon à base de l'acide gallique est également préparée à des concentrations allant de 0 à 500 μ g/mL. Les teneurs en polyphénols totaux des extraits sont exprimées en μ g par gramme d'extrait et en milligramme équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g MS).

2.4 Evaluation des activités biologiques

2.4.1 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits de graines de *P. harmala* L. a été évaluée à l'aide de la méthode du DPPH.

2.4.1.1 Piégeage du radical libre DPPH

Le protocole expérimental suivi est celui décrit par **Atoui et al. (2005)**.

➤ Principe

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH). Ce dernier est réduit en acceptant un atome d'hydrogène. Le DPPH est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confèrent une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un piègeur de radicaux libres (**Brand-Williams et al., 1995**).

➤ Mode opératoire

À différentes concentrations, 50 µl de chaque extrait, sont ajoutés à 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH° à 6.34×10^{-5} M (0.0025 g dans 100 ml éthanol). Pour chaque concentration un blanc est préparé. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé, en parallèle, en mélangeant 50 µl du solvant utilisé avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la réduction du DPPH° s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution. La lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le témoin positif utilisé est le butylhydroxytoluène (BHT). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{DO témoin} - \text{DO échantillon}}{\text{DO témoin}} \times 100$$

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50 % d'inhibition (IC_{50}). Une valeur d' IC_{50} faible correspond à une grande efficacité de l'extrait.

2.4.2 Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des trois extraits des graines de *P. harmala* L. a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion en milieu solide par disque, afin d'étudier la sensibilité des souches microbiennes testées. Cette méthode permet de mesurer les zones d'inhibition formées autour des disques contenant les extraits. Par ailleurs, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée afin de quantifier l'efficacité antimicrobienne des extraits.

2.4.2.1 Méthodes de diffusion sur disques

L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque, selon le protocole de **Bauer et al. (1966)**. Le principe de ce test repose sur la diffusion des composés antimicrobiens à différentes concentrations en milieu solide par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (mm).

2.4.2.2 Souches microbiennes testées

Cette étude a utilisé des souches microbiennes (souches de références) comprenant des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et une levure (**Tableau 3**).

Tableau 3: Souches de référence utilisées dans l'étude.

Bactéries à Gram positif	Référence
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 15307
Bactéries à Gram négatif	Référence
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 70603
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
Champignons	Référence
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

Les souches microbiennes utilisées dans cette étude proviennent de collections de référence (ATCC) et ont été utilisées pour évaluer les activités antibactériennes et antifongiques des extraits.

2.4.2.3 Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés dans ce test sont le milieu bouillon Mueller-Hinton (MH), la gélose Mueller-Hinton (MH), la gélose nutritive (GN), le bouillon nutritif (BN), la gélose sabouraud et l'eau physiologique.

2.4.2.4 Préparation de l'inoculum microbien

Après 24 heures d'incubation des souches bactériennes testées, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques de chaque souche ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine. Puis, elles ont ensuite été transférées dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile à 0,9 % et les tubes ont été homogénéisés au vortex. La densité de l'inoculum a été ajustée à 0,5 McFarland (10^8 cellules/mL) (Gayathiri et al., 2018 ; Boussena, 2019).

2.4.2.5 Test de sensibilité

Le milieu de culture gélosé (MH) a été coulé aseptiquement. Après solidification, la surface des boîtes a étéensemencée uniformément à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne standardisée (0,5 McFarland). Après un court temps de séchage (≈ 5 min), des disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre ont été déposés à la surface de la gélose. Ces disques ont été imprégnés des différents extraits, préalablement dissous dans le DMSO (5%), à l'aide d'une micropipette un volume de 10 μ l été pris, puis appliqués sur la géloseensemencée. Une antibiotique gentamicine (CN10) a été utilisée comme témoin positif pour la majorité des souches bactériennes, tandis que l'antifongique amphotéricine B (AMB20) a été utilisée pour *Candida albicans*. Les boîtes ont été laissées à 4 °C pendant environ 1h à 3h afin de permettre la diffusion des substances actives, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. L'activité antimicrobienne a été évaluée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques, exprimés en millimètres. La méthode de diffusion sur disque est une technique couramment utilisée pour l'évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne des composés bioactifs (Hossain, 2024).

2.4.2.6 Technique de microdilution : détermination de la CMI

La méthode de dilution en milieu liquide permet d'évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits, correspondant à la plus faible concentration capable d'inhiber la croissance microbienne après incubation.

La microplaque à 96 puits permet de déterminer la CMI des différents extraits végétaux. Dans les puits des colonnes de 1 à 12, 100 μ L de bouillon Mueller-Hinton sont introduits à l'aide d'une micropipette munie d'un embout stérile, puis 100 μ L de l'extrait végétal sont ajoutés dans le premier puits. Une dilution en série est réalisée de puits en puits (100 μ L transférés successivement). Un facteur de dilution de $\frac{1}{2}$ est pris en compte dans le calcul des concentrations des produits à tester. Chaque puits contient donc 100 μ L de bouillon et le produit testé dilué au $\frac{1}{2}$. Ensuite 100 μ L de l'inoculum (10^6 UFC/mL) sont ajoutés dans tous les puits, à l'exception de deux dernières lignes (témoin négatif contenant 100 μ L du MHB+100 μ L de l'extrait et le témoin positif contenant 100 μ L du MHB + 100 μ L de l'inoculum). Le DMSO est utilisé à une concentration de 5%.

La microplaque est couverte et incubée à 37 °C pendant 24 h et la lecture a été effectuée à l'œil nu (NCCLS, 2001).

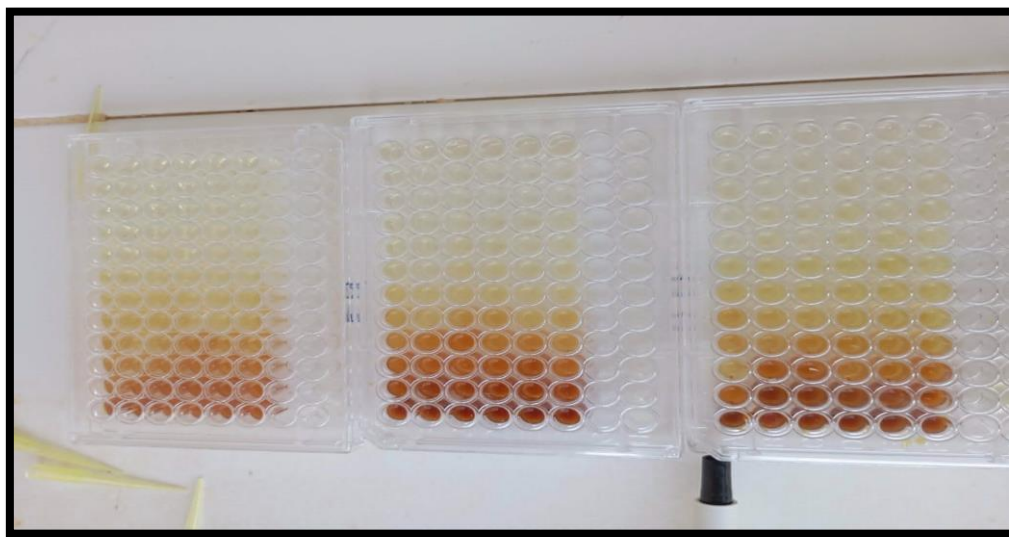


Figure 7: Préparation du test de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des trois extraits de *P. harmala* L. (image personnel).

2.4.3 Activité antibiofilm des extraits de *Peganum harmala* L.

On a évalué la capacité de formation du biofilm Ainsi que l'activité antibiofilm et antiadhérente des extraits de *Peganum harmala* L., (extrait méthanolique obtenu par macération, extrait éthanolique obtenu par macération et par reflux) via le protocole de la microplaque 96 puits décrit par **O'Toole et al. (2000)**, avec une coloration au cristal violet et une lecture spectrophotométrique. La technique utilisée était la TCP.

2.4.3.1 Formation de biofilm

La capacité des souches bactériennes à former un biofilm a été déterminée en incubant des suspensions bactériennes fraîches dans des microplaques stériles à 96 puits. Pour chaque puits, une quantité standard (0,5 McFarland) a été déposée, préparée avec un milieu de culture approprié. La plaque a été incubée à 37 °C pendant 24 h afin de permettre l'adhésion et la formation du biofilm. Après incubation, le contenu des puits a été éliminé, puis les puits ont été lavés délicatement trois fois avec une solution saline stérile afin d'éliminer efficacement les cellules planctoniques non adhérentes. Le biofilm fixé sur les parois des puits a été coloré avec du cristal violet, puis l'excès de colorant a été éliminé par lavage. Le colorant fixé a ensuite été solubilisé à l'aide d'un solvant approprié (éthanol 96%) , et l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaque à une longueur d'onde de 630 (**Bardbari et al., 2018; Fadl , 2018; Khozani et al., 2018 Hakimi Alni et al., 2020 ;Karyne et al., 2020**).



Figure 8: Préparation de la microplaque pour le test de formation du biofilm (image personnel).

La classification des souches selon leur aptitude à former un biofilm a été réalisée suivant les critères de **Christensen et al. (1985)**, (Tableau 4).

Tableau 4: Classification des souches selon leur capacité de formation de biofilm.

Densité optique (DO)	Classification
$DO \leq DO_t$	Non-formatrice de biofilm
$DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$	Modérément formatrice de biofilm
$DO \geq DO_t \times 4$	Fortement formatrice de biofilm

2.4.3.1 Inhibition de la formation du biofilm

L'activité inhibitrice des extraits de *P. harmala* L. sur la formation du biofilm a été évaluée en Co-incubant les suspensions bactériennes avec une concentration de 400 mg/mL des trois extraits, directement dans les puits d'une microplaque à 96 puits. En fait, cette stratégie expérimentale repose sur la microfiltration décrite, au départ par **O'Toole et al. (2000)**, et elle est encore largement utilisée pour évaluer l'inhibition de la formation du biofilm par des composés naturels (**Stepanović et al., 2007 ; Christensen et al., 1985 ; Nostro et al., 2007**). Les plaques ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 h, dans les mêmes conditions que celles prévues pour le test de formation du biofilm. Après cette incubation, les étapes de lavage, de coloration au cristal violet, puis solubilisation et enfin lecture de la densité optique ont été faites comme indiqué précédemment. Le pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm a été calculé en mettant en regard la densité optique des cultures exposées au traitement avec celle des témoins non traités.

Le pourcentage d'inhibition du biofilm a été calculé selon la formule :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{DO \text{ témoin} - DO \text{ test}}{DO \text{ témoin}} \times 100$$

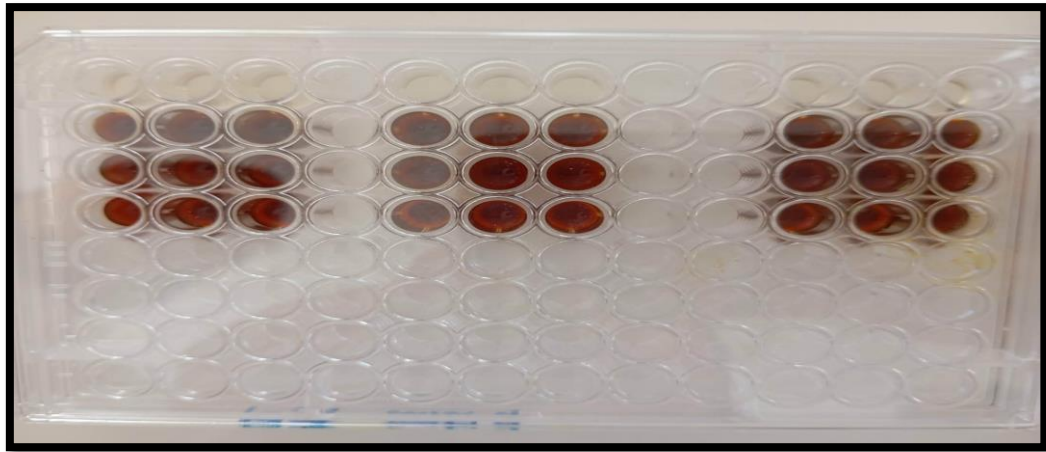


Figure 9: Microplaque utilisée pour l'évaluation de l'activité antiadhérente (image personnel).

2.4.3.2 Effet des extraits de *Peganum harmala* L. sur un biofilm préformé

Après formation de biofilm par la technique déjà décrite et une incubation à 37°C pendant 24h, les microplaques de 96 puits étaient rincées et mises en contact avec 150µL de différents extraits avec une concentration de 400mg/mL, et incubées à 37°C pendant 24h selon l'étude de **Bardbari et al. (2018)** Après cette incubation, les étapes de lavage, de coloration au cristal violet, puis solubilisation et enfin lecture de la densité optique ont été faites comme indiqué précédemment. Le contrôle positif était les bactéries présentes dans le milieu de culture sans extraits.



Résultats et discussion



3 Résultats et discussion

3.1 Rendements des extraits

Après l'extraction et l'élimination des traces de solvant, les extraits EtOH et MeOH des graines de *P. harmala* L ont été évaluée en termes de leur rendement d'extraction (Rd %) et leur couleur. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 5**.

Tableau 5: Rendements d'extraction et caractéristiques des extraits de *P. harmala* L.

Extraits	Couleur	Rendement
Extrait méthanolique par macération	Brun foncé	21,66 %
Extrait éthanolique par macération	Brun clair	12,66 %
Extrait éthanolique par reflux	Brun	13,00 %

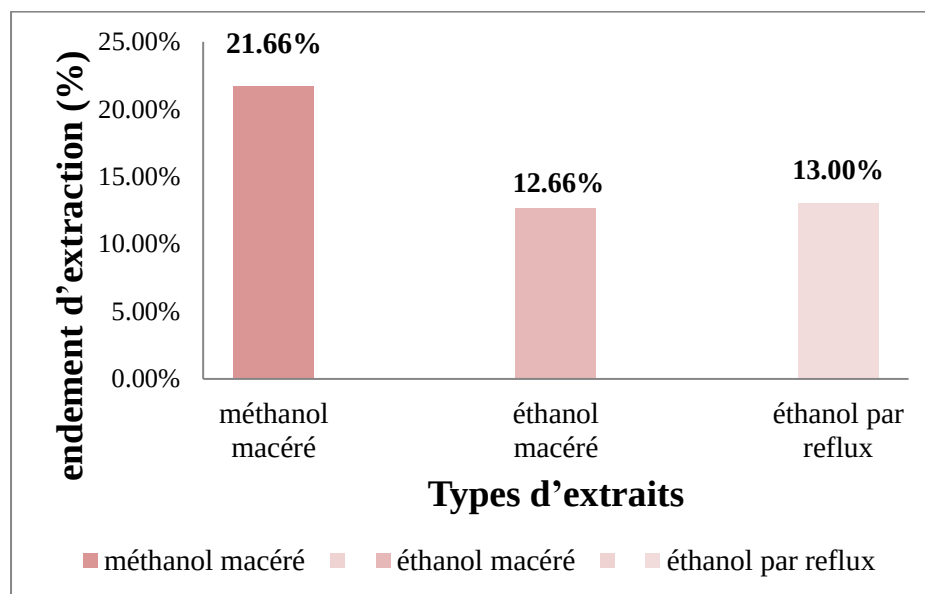


Figure 10: Rendements des différents extraits de *P. harmala* L.

Le rendement d'extraction des graines de *P. harmala* L. a présenté une variation en fonction du solvant et de la méthode d'extraction utilisées. En effet, l'extrait MeOH obtenu par macération a présenté le rendement le plus élevé (**21,66 %**), suivi par l'extrait EtOH obtenu par reflux (**13 %**), puis par l'extrait EtOH obtenu par macération (**12,66 %**) (**Tableau 5**). Cette différence peut être attribuée principalement à la polarité du solvant ainsi qu'à l'efficacité de la méthode d'extraction.

Par ailleurs, les extraits obtenus ont présenté des différences de coloration : l'extrait MeOH était de couleur brun foncé, tandis que les extraits EtOH étaient de couleur brun clair à brun foncé, ce qui reflète la diversité et la concentration des composés phytochimiques extraits en fonction du solvant utilisé.

En effet, le méthanol, solvant plus polaire que l'éthanol, permet une meilleure extraction des composés bioactifs, notamment les alcaloïdes et les composés phénoliques présents dans les graines de *P. harmala* L., ce qui explique le rendement plus élevé observé. Des travaux antérieurs ont confirmé que la polarité du solvant influence fortement le rendement d'extraction, le méthanol donnant généralement des rendements plus élevés que l'éthanol (**Do et al., 2014 ; Wakeel et al., 2019**).

De plus, la méthode de reflux a légèrement amélioré le rendement de l'extraction EtOH (**13 %**) par rapport à la macération (**12,66 %**), probablement en raison de l'augmentation de la température qui favorise la diffusion et la solubilisation des composés bioactifs. Cette influence de la technique d'extraction a également été rapportée par (**Azwanida, 2015**), qui a montré que les méthodes à chaud augmentent généralement l'efficacité d'extraction.

À titre de comparaison, plusieurs études ont rapporté des rendements variables pour les extraits de *P. harmala* L. Par exemple, (**Saeedeh et al., 2022**) ont obtenu un rendement en extrait MeOH élevé (~ 29,7 %), supérieur à celui de notre étude, tandis que (**Dehiri et al., 2022**) ont rapporté un rendement en extrait EtOH plus faible (~ 12,8 %). Ces différences confirment l'influence du solvant et des conditions expérimentales sur le rendement.

Enfin, les variations observées entre les différents travaux peuvent être expliquées par plusieurs facteurs, notamment la nature du solvant, la méthode d'extraction, la durée d'extraction, ainsi que les conditions environnementales telles que la région et la période de récolte de la plante (**Dhanani et al., 2017**).

3.2 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des graines de *P. harmala* L. a été mesurée par la méthode de FC, suivant le protocole de **Boucif et al. (2023)**, avec l'acide gallique comme standard. La quantification a été réalisée à partir de la courbe d'étalonnage, dont l'équation de régression était $y = 0,0029x$ et le coefficient de corrélation $R^2 = 0,991$ (Figure 11).

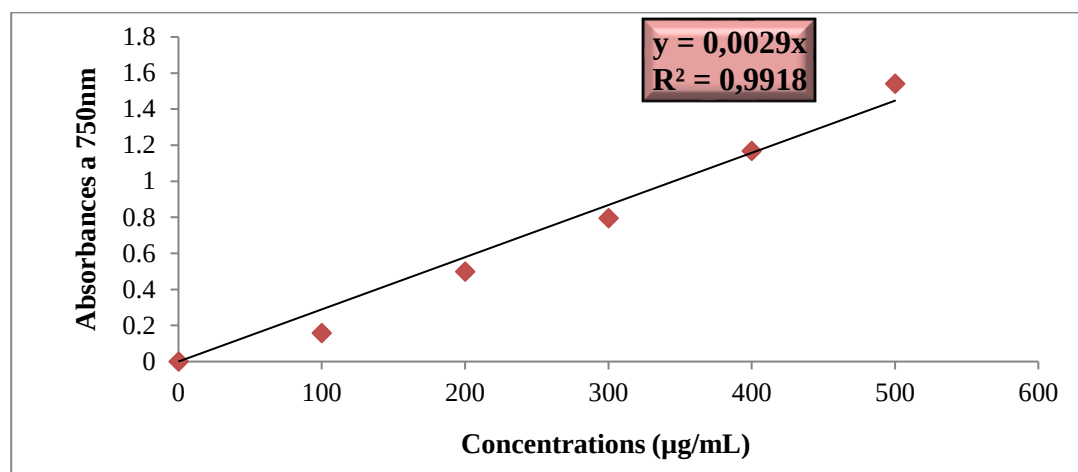


Figure 11: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux des graines de *P. harmala* L. sont présentés dans le **Tableau 6** pour les trois extraits suivants : MeOH macéré, extrait EtOH et extrait EtOH sous reflux.

Tableau 6: Quantification des composés phénoliques des extraits des graines de *P. harmala* L. (extrait EtOH macéré, extrait EtOH sous reflux et extrait MeOH).

Extraits	Polyphénols totaux (mg EAG/g MS)	Polyphénols totaux (µg/mL)
Extrait MeOH macéré	45,7 ± 0,59	843,3 ± 11,03
Extrait EtOH macéré	12 ± 0,36	378,9 ± 11,47
Extrait EtOH sous reflux	14,3 ± 0,20	14,3 ± 0,20

L'histogramme montre une variation importante des teneurs en polyphénols totaux entre les trois extraits de *P. harmala* L. : MtOH macéré, EtOH macéré et EtOH sous reflux (Figure 12).

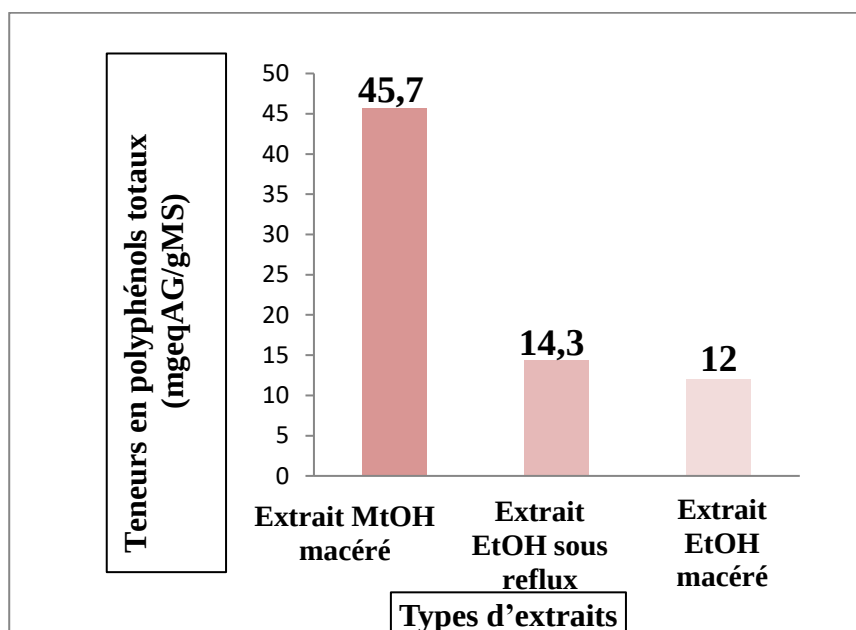


Figure 12: Teneurs en polyphénols totaux des extraits EtOH macéré, MeOH macéré et EtOH sous reflux obtenus à partir des graines de *P. harmala* L.

Les dosages des composés phénoliques totaux réalisés sur les extraits de graines de *P. harmala* L. ont montré des différences claires selon le solvant utilisé et le mode d'extraction. Les résultats montrent que l'extrait MeOH par macération a la valeur la plus élevée ($45,7 \pm 0,59$ mg EAG/g MS), alors que les extraits EtOH donnent des valeurs plus basses, soit $14,3 \pm 0,20$ mg EAG/g MS pour l'extrait sous reflux et $12 \pm 0,36$ mg EAG/g MS pour la macération. Ces grandes différences montrent bien que le choix du solvant est très important dans l'extraction des composés phénoliques. Le mélange méthanol/eau semble très bon à cause de sa grande polarité qui aide à dissoudre une grande diversité de composés présents dans les graines. Cette observation est en accord avec **Sultana et al. (2009)**, qui ont montré que les solvants méthanoliques hydroalcooliques permettent une meilleure extraction des composés phénoliques que l'éthanol.

La comparaison entre macération et reflux montre que l'augmentation de la température améliore légèrement le rendement d'extraction dans le cas de l'éthanol. Cela peut s'expliquer par une diffusion plus rapide des composés à travers les structures cellulaires sous l'effet de la chaleur. Cependant, cet effet reste limité, ce qui peut indiquer que certains composés phénoliques sont sensibles à la chaleur, comme l'ont rapporté **Azmir et al. (2013)**.

En comparant nos résultats avec la littérature, les valeurs obtenues pour l'extrait méthanolique sont généralement plus élevées que celles rapportées dans plusieurs études sur *P. harmala* L. Par exemple, **Iqbal et al. (2019)** ont trouvé environ 30,9 mg EAG/g MS, tandis que **Saeedeh et al. (2021)** ont rapporté une valeur proche de 30,46 mg EAG/g MS pour un extrait méthanolique.

Ces différences peuvent être dues soit à une meilleure efficacité de notre protocole d'extraction, soit à des variations liées aux conditions expérimentales et à la nature des échantillons. En général, les différences entre nos résultats et ceux de la littérature peuvent être expliquées par plusieurs facteurs comme le type de solvant, la méthode d'extraction ainsi que les conditions de croissance de la plante et sa composition chimique naturelle. Ces paramètres influencent directement la quantité et la stabilité des composés phénoliques des extraits (**Altemimi et al., 2017**).

En conclusion, nos résultats montrent que le méthanol par macération est clairement la méthode la plus efficace pour extraire les composés phénoliques des graines de *P. harmala* L. Les extraits EtOH sont moins performants, ce qui souligne l'importance du choix du solvant dans les études phytochimiques.

3.3 Evaluation des activités biologiques

3.3.1 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des graines de *P. harmala* L. a été évaluée à l'aide du test DPPH. Cette méthode repose sur la capacité des composés antioxydants présents dans l'extrait à piéger le radical libre DPPH, avec un changement de couleur qui est mesuré par spectrophotométrie.

3.3.1.1 Activité antioxydante du BHT comme control positif

Le BHT (butylhydroxytoluène) a été utilisé comme contrôle positif pour comparer l'activité antioxydante des extraits étudiés par le test DPPH. Le BHT a montré une valeur d'IC₅₀ de $0,0146 \pm 0,0008$ mg/mL, ce qui témoigne qu'il a une forte activité antioxydante.

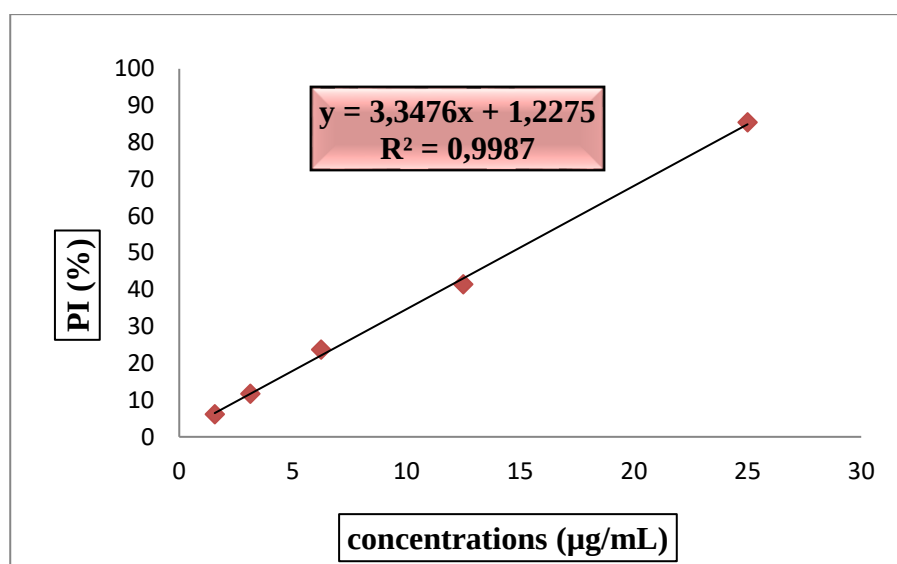


Figure 13: Courbe d'inhibition radicalaire du BHT en fonction de la concentration.

3.3.1.2 Piégeage du radical libre DPPH

Le test DPPH est couramment employé pour estimer rapidement, et avec une bonne sensibilité, le potentiel antioxydant d'un composé pur ou d'extraits de plantes (Khadhr et al., 2017).

- Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations testées de l'extrait MeOH macéré, illustré dans **tableau 7**.

Tableau 7: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations.

	Extrait MeOH macéré				
Concentration (mg/mL)	0,75	1	1,5	2	4
Pourcentage d'inhibition (%)	1,45 ± 0,21	4,89 ± 0,21	5,17 ± 0,08	7,65 ± 0,62	10,09 ± 0,49

Les pourcentages d'inhibition (PI %) du radical DPPH par l'extrait MeOH macéré sont présentés dans la **figure 14**.

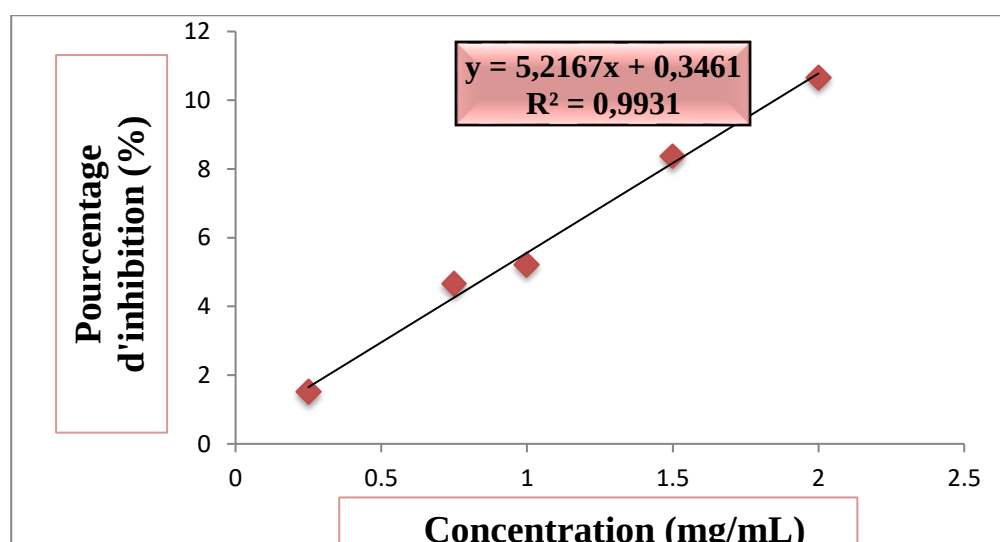


Figure 14: Courbe du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration.

Les résultats obtenus avec l'extrait MeOH macéré montrent que l'activité antioxydante croît progressivement avec la concentration. Ainsi, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH passe de 1,45 ± 0,21 % à 0,75 mg/mL à 10,09 ± 0,49 % à 4 mg/mL. On observe bien, au cours de cette évolution, une relation dose-dépendante. Cela signifie que plus la concentration de l'extrait n'est élevée, plus sa capacité à piéger les radicaux libres est importante.

Ce comportement suggère la présence de composés capable de céder des électrons ou des atomes hydrogène, responsable de l'activité antioxydante (**Blois, 1958 ; Brand-Williams et al., 1995**). Cependant, malgré cette augmentation, les pourcentages d'inhibition restent globalement faibles. Même à la concentration la plus élevée testée, l'activité ne dépasse pas environ 10 % ce qui montre que l'extrait MeOH possède une activité antioxydante limitée.

Cette faible activité peut s'expliquer par une concentration relativement faible en composés bioactifs tels que les polyphénols et les flavonoïdes, ou par une extraction non optimale de ces composés.

- Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations testées pour l'extrait EtOH sous reflux qui sont illustrés dans le **tableau 8**.

Tableau 8: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations.

	Extrait EtOH sous reflux				
Concentration (mg/mL)	0,75	1	1,5	2	4
Pourcentage d'inhibition (%)	2,12 ± 0,22	3,79 ± 0,38	5,03 ± 0,83	24,31 ± 1,20	53,71 ± 0,73

Les pourcentages d'inhibition (PI %) du radical DPPH par l'extrait EtOH sous reflux sont présentés dans la **figure 15**.

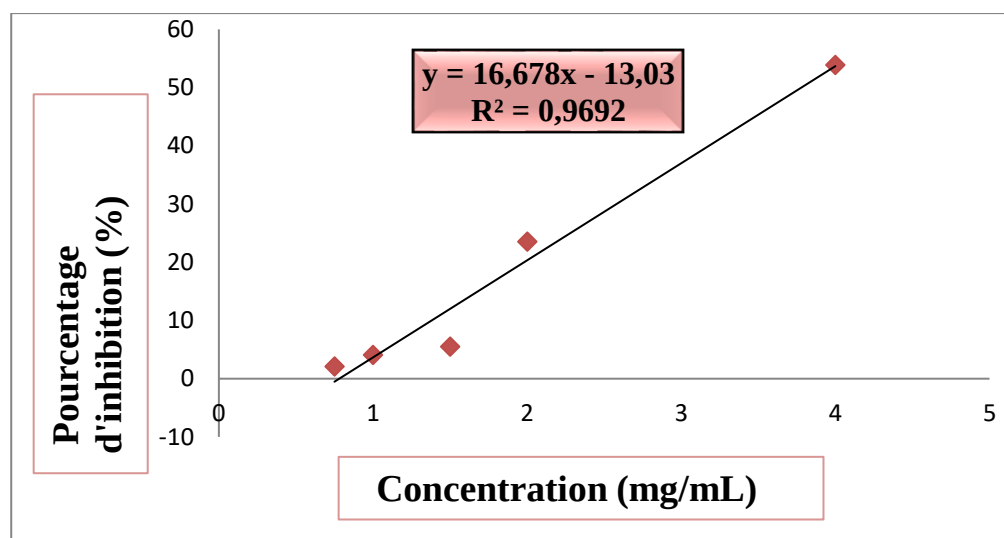


Figure 15: Courbe du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration.

La valeur de l' IC_{50} de l'extrait EtOH sous reflux est présentée dans le **tableau 9**.

Tableau 9: Valeur de l' IC_{50} de l'extrait EtOH sous reflux.

Paramètre	Valeur
IC_{50}	$3,78 \pm 0,02$ mg/ML

Les résultats ont montré que l'extrait EtOH sous reflux avait une activité de piégeage du radical libre DPPH, avec un pourcentage d'inhibition de $53,71 \pm 0,73$ % à la concentration de 4 mg/mL. L' IC_{50} de l'extrait a été estimée à $3,78 \pm 0,02$ mg/mL, ce qui indique une capacité antioxydante modérée.

Comparativement au BHT, qui a présenté une activité antioxydante beaucoup plus importante avec une IC_{50} de $0,0146 \pm 0,0008$ mg/mL, l'extrait étudié a montré une activité plus faible. Cette différence suggère que le BHT possède une efficacité plus élevée dans la neutralisation des radicaux libres par rapport à l'extrait étudié. Toutefois, l'activité observée pour l'extrait reste intéressante et pourrait être liée à la présence de composés phénoliques et d'autres substances bioactives capables de piéger les radicaux libres. Ainsi, l'extrait EtOH sous reflux peut être considéré comme une source naturelle potentielle d'antioxydants.

- Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations testées pour l'extrait EtOH macéré, comme illustrés dans le **tableau 10**.

Tableau 10: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations.

	Extrait EtOH macéré				
Concentration (mg/mL)	0,75	1	1,5	2	4
Pourcentage d'inhibition (%)	4,99 ± 0,30	7,80 ± 0,66	22,79 ± 0,36	34,14 ± 0,38	51,28 ± 0,22

Les pourcentages d'inhibition (PI %) du radical DPPH par l'extrait EtOH macéré sont présentés dans la **figure 16**.

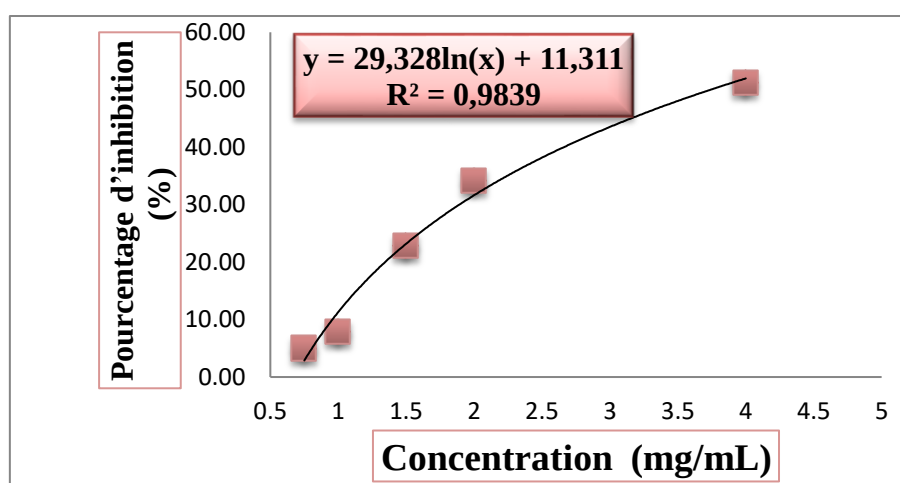


Figure 16: Courbe du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations pour le piégeage de radical DPPH.

La valeur de l'IC₅₀ de l'extrait EtOH macéré est présentée dans le **tableau 11**.

Tableau 11: Valeur de l'IC₅₀ de l'extrait EtOH macéré.

Paramètre	Valeur
IC ₅₀	3,74 ± 0,04

Le test DPPH a montré que l'extrait EtOH macéré présentait des pourcentages d'inhibition allant de faibles valeurs jusqu'à environ 51,28 ± 0,22 %, ce qui indique une activité antioxydante globale modérée. Comparativement au BHT, qui présente une activité supérieure avec une IC₅₀ de 0,0146 ± 0,0008 mg/mL, l'extrait étudié montre une activité antioxydante plus faible. Cela signifie que son pouvoir de neutralisation des radicaux libres est nettement supérieur à celui de l'extrait étudié avec une IC₅₀ de 3,74 ± 0,04 mg/mL.

Les résultats obtenus pourraient également être influencés par la qualité des graines de *P. harmala* L. utilisées dans cette étude ; la composition en métabolites bioactifs peut varier selon les conditions de culture, de récolte et de conservation. Malgré cela, les résultats montrent une activité antioxydante modérée et la plus importante parmi les extraits étudiés.

La comparaison des trois extraits montre que les extraits EtOH obtenus par macération et par extraction sous reflux présentent des résultats très proches, avec des valeurs d'IC₅₀ de 3,74 ± 0,04 mg/mL et 3,78 ± 0,02 mg/mL. Cette petite différence montre que la méthode d'extraction n'a pas un grand effet sur l'activité antiradicalaire des composés extraits par l'éthanol. D'un autre côté, l'extrait MeOH macéré n'a pas pu atteindre 50 % d'inhibition du radical DPPH dans les conditions de test, ce qui a empêché de savoir sa valeur d'IC₅₀.

Ce résultat montre une activité antioxydante plus faible comparée aux extraits EtOH. Donc les extraits hydro-éthanoliques semblent être les meilleurs pour extraire les composés responsables de l'activité antioxydante.

3.3.2 Activité antimicrobienne

L'évaluation de cette activité a été réalisée en observant la formation des zones d'inhibition (ZI) autour des disques contenant les extraits étudiés. Les diamètres des ZI varient en fonction du type de bactéries ainsi que des extraits testés. Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 12**.

Tableau 12: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance des souches microbienne testées.

Extraits	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)							
	Bactéries à Gram positif					Bactéries à Gram négatif		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Antibiotique (CN10)	14	24	24	30	17	18	20	21
MeOH macéré	14	23	25	25	18	10	25	13
EtOH macéré	17	20	20	30	16	17	20	8
EtOH sous reflux	13	20	20	25	20	10	22	14

Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance de *C. albicans*

Extraits	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
	Antifongique (AMB 20)	MeOH macéré	EtOH macéré	EtOH sous reflux
Levure (<i>C. albicans</i>)	28	12	8	10

- Les figures 17, 18 et 19 illustrent l'activité antimicrobienne des souches bactériennes évaluée par la méthode de diffusion sur disque.

GRAM +

B. subtilis



B. cereus



S. aureus



M. luteus



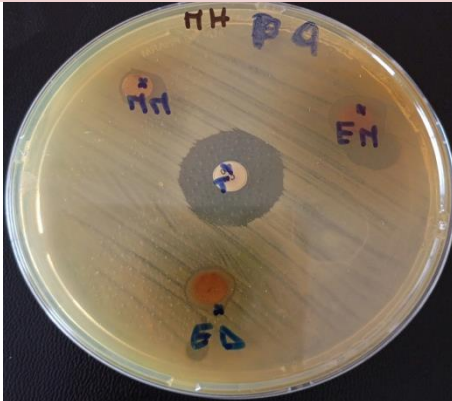
E. faecalis



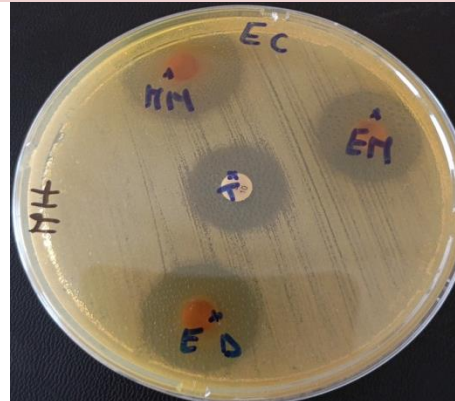
Figure 17: Zones d'inhibition des extraits de *P. harmala* L. (EtOH, MeOH et extrait hydro-éthanolique obtenu sous reflux) et du CN10 sur les bactéries à Gram positif.

GRAM -

P. aeruginosa



E. coli



K. pneumoniae



Figure 18: Zones d'inhibition des extraits de *P. harmala* L. (EtOH, MeOH et extrait hydro-éthanolique obtenu sous reflux) et du CN10 sur les bactéries à Gram négatif (image personnel).

Levure

C. albicans



Figure 19: Zones d'inhibition des extraits de *P. harmala* L. (EtOH, MeOH et extrait hydro-éthanolique obtenu sous reflux) et du AMB 20 sur levure *candida albicans*

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *P. harmala* L. a montré des zones d'inhibition variables selon les souches microbiennes et le type d'extraction utilisé.

Les résultats indiquent que les diamètres d'inhibition restent globalement modérés, compris entre 9 et 25 mm selon les extraits et les souches testées.

Chez *E. coli*, l'extrait MeOH macéré a présenté la meilleure activité (25 mm), dépassant le témoin (22 mm), tandis que les extraits EtOH ont montré une inhibition plus faible (1 mm pour EtOH obtenu par reflux et 9 mm pour EtOH obtenu par macération).

Pour *P. aeruginosa*, une faible sensibilité a été observée avec des ZI de 12 mm pour l'extrait MeOH et de 1 mm pour les extraits EtOH, comparativement à 18 mm pour le témoin.

Concernant *S. aureus*, l'extrait EtOH macéré a montré une activité légèrement supérieure (17 mm) par rapport au témoin et aux autres extraits (13–14 mm).

Une sensibilité particulièrement élevée a été observée chez *M. luteus*, avec des zones d'inhibition variant entre 25 et 30 mm selon les extraits. L'extrait hydro-éthanolique obtenu par macération a présenté la meilleure activité (30 mm), atteignant une efficacité comparable à celle du témoin antibiotique.

Les espèces du genre *B. cereus* et *B. subtilis* ont présenté une sensibilité relativement plus élevée. Chez *B. subtilis*, l'extrait MeOH macéré a donné la plus grande ZI (25 mm), dépassant légèrement le témoin (24 mm), tandis que l'extrait EtOH obtenu par reflux a montré une activité nettement plus modérée (20 mm). Chez *B. cereus*, l'extrait MeOH macéré a montré la meilleure activité avec une zone d'inhibition de 23 mm, très proche de celle du témoin antibiotique (24 mm). Les extraits EtOH ont présenté une activité légèrement plus faible, avec des diamètres d'inhibition de 20 mm pour l'extrait EtOH macéré et 20 mm pour l'extrait EtOH sous reflux.

Pour *K. pneumoniae*, toutes les ZI obtenues avec les extraits (9 à 14 mm) sont restées inférieures à celle du témoin (21 mm).

Chez *C. albicans*, le témoin antifongique (AMB 20) a présenté la plus forte activité avec une zone d'inhibition de (28 mm). Les extraits de *P. harmala* L. ont montré une activité antifongique faible mais mesurable, avec des diamètres d'inhibition de (12 mm) pour l'extrait MeOH macéré, (8 mm) pour l'extrait EtOH macéré et (1 mm) pour l'extrait EtOH sous reflux. Ces valeurs restent nettement inférieures à celle du témoin, traduisant une activité antifongique limitée dans les conditions expérimentales utilisées. Ces résultats suggèrent une activité antimicrobienne globalement limitée des extraits testés dans les conditions expérimentales.

Malgré ces faibles valeurs, le résultat observé reste en accord avec plusieurs travaux antérieurs, notamment ceux de **Mansour et al. (2011)** et **Jebali et al. (2015)** qui ont montré une sensibilité plus élevée des bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif. La comparaison avec ces travaux montre des différences importantes en termes de valeurs, ce qui suggère que l'optimisation des conditions expérimentales, notamment la concentration et la méthode d'extraction, est essentielle pour mieux exploiter le potentiel antimicrobien de cette plante. Cette différence de sensibilité peut être expliquée par la structure de la paroi cellulaire. En effet, selon **Simões et al. (2009)** la membrane externe des bactéries à Gram négatif constitue une barrière limitant la pénétration des composés antimicrobiens d'origine végétale. Par ailleurs, l'activité des extraits semble dépendre du solvant utilisé, ce qui est également en accord avec la littérature. Le méthanol, plus polaire, favoriserait l'extraction de certains composés actifs, ce qui expliquerait les meilleures performances observées avec l'extrait MeOH macéré. Un point important est l'activité relativement élevée du témoin (jusqu'à 24 mm), parfois comparable ou supérieure à celle des extraits. L'extrait MeOH macéré apparaît comme le plus actif.

3.3.2.1 Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents extraits vis-à-vis des microorganismes testés a également été déterminée (**Tableau 14**).

Tableau 14: Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits végétaux obtenus sur les souches microbiennes testées

CMI								
Extraits	Concentration (mg/mL)							
	Gram+					Gram-		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
MeOH macéré	1,56	0,09	0,39	0,39	6,25	100	3,12	6,25
EtOH macéré	3,12	1,56	0,78	1,56	6,26	12,5	1,56	12,5
EtOH sous reflux	1,56	0,78	1,56	1,56	0,19	12,5	1,56	3,12

Les résultats indiquent que l'activité antimicrobienne des extraits dépend de la méthode d'extraction ainsi que de la sensibilité des souches bactériennes testées. D'une manière générale, les bactéries à Gram positif se sont montrées plus sensibles que les bactéries à Gram négatif.

Pour l'extrait EtOH macéré, la meilleure activité a été observée contre *Bacillus subtilis* avec une CMI de 0,78 mg/mL. *Bacillus cereus* et *Micrococcus luteus* ont également montré une bonne sensibilité avec des CMI de 1,56 mg/mL. En revanche, *Staphylococcus aureus* a présenté une sensibilité plus faible avec une CMI de 3,12 mg/mL. Chez les bactéries à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* ont enregistré les valeurs les plus élevées, ce qui traduit une forte résistance.

L'extrait MeOH macéré a montré l'activité antibactérienne la plus importante parmi tous les extraits testés. La plus faible CMI a été observée chez *B. cereus* avec une valeur de 0,09 mg/mL. *B. subtilis* et *M. luteus* ont également montré une forte sensibilité avec des CMI de 0,39 mg/mL. En revanche, *P. aeruginosa* s'est révélé très résistante avec une CMI élevée de 100 mg/mL.

Concernant l'extrait EtOH sous reflux, une activité intéressante a été observée contre plusieurs souches bactériennes. *E. faecalis* a présenté la meilleure sensibilité avec une CMI de 0,19 mg/mL. *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus* ainsi que *E. coli* ont présenté des valeurs identiques de 1,56 mg/mL. La souche *P. aeruginosa* demeure la plus résistante avec une CMI de 12,5 mg/mL.

Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par **Benali et al. (2022)**, qui ont montré que l'extrait EtOH de *P. harmala* L. possède une activité antimicrobienne importante avec des CMI de 12,5 mg/mL contre plusieurs souches bactériennes. Les auteurs ont également signalé une variation de la sensibilité bactérienne selon les microorganismes testés, ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans cette étude.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus confirment le potentiel antimicrobien des extraits étudiés, en particulier les extraits MeOH et EtOH, qui ont montré des activités importantes contre plusieurs souches microbiennes.

3.3.3 Activités antibiofilm de l'extrait de *Peganum harmala* L.

L'évaluation des activités antibiofilm et antiadhérentes de l'extrait de *P. harmala* L. a été réalisée à l'aide d'essais sur microplaques 96 puits impliquant six souches bactériennes. La capacité de formation du biofilm, ainsi que l'effet inhibiteur de l'extrait sur la formation du biofilm et l'adhésion bactérienne, ont été déterminés par la méthode de coloration au cristal violet. La quantification a été effectuée par lecture de la densité optique au moyen d'un spectrophotomètre de microplaques.

3.3.3.1 Formation du biofilm des souches bactériennes

Après mesure de la DO à l'aide d'un lecteur de microplaques, les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 15**. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais accompagnée de l'écart type.

Tableau 15: Valeurs de densité optique de la formation du biofilm des souches bactériennes non traitées.

Témoin	0,05					
souches bactérienne	<i>B. cereus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
(DO brute)	0,14±	0,14±	0,15±	0,22±	0,22±	0,24±
	0,002	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01

Les valeurs de densité optique obtenues montrent que toutes les souches bactériennes testées sont capables de former un biofilm. La plus forte valeur a été enregistrée chez *P. aeruginosa* ($0,24 \pm 0,01$), suivie de *S. aureus* et *K. pneumoniae* ($0,22 \pm 0,02$ et $0,22 \pm 0,01$ respectivement). En revanche, *E. coli*, *M. luteus* et *B. cereus* ont présenté des valeurs plus faibles. Ces résultats indiquent une capacité variable de formation du biofilm selon les espèces bactériennes étudiées.

- Les résultats de la capacité de formation de biofilm des souches bactériennes étudiées sont présentés dans le **tableau 16**.

Tableau 16: Classification des souches bactériennes selon leur capacité de formation de biofilm.

Souches	Formation de biofilm		
	Forte	Modéré	Faible
<i>E. coli</i>		+	
<i>S. aureus</i>	+		
<i>M. luteus</i>		+	
<i>B. cereus</i>		+	
<i>k. pneumoniae</i>	+		
<i>P. aeruginosa</i>	+		

D'après les résultats, on voit que les souches bactériennes testées ont des capacités différentes à former un biofilm selon les seuils de **Christensen et al. (1985)**, allant de modérément à fortement formatrices. Les souches *Bacillus cereus* ($0,14 \pm 0,002$), *Micrococcus luteus* ($0,14 \pm 0,01$) et *Escherichia coli* ($0,15 \pm 0,03$) ont des valeurs de DO entre 0,10 et 0,20. Elles sont donc classées comme modérément formatrices de biofilm. Cette catégorie montre une capacité intermédiaire d'adhésion aux surfaces et de production de matrice extracellulaire qui permet une adaptation aux conditions environnementales sans atteindre une forte structuration du biofilm.

Les souches *Staphylococcus aureus* ($0,22 \pm 0,02$), *Klebsiella pneumoniae* ($0,22 \pm 0,01$) et *Pseudomonas aeruginosa* ($0,24 \pm 0,01$) ont des valeurs de DO supérieures à 0,20 ce qui les classe comme fortement formatrices de biofilm. Ces souches montrent donc une grande capacité d'adhésion et production d'un biofilm mature souvent associée à une meilleure persistance dans l'environnement ainsi qu'une résistance accrue aux agents antimicrobiens.

En plus *Pseudomonas aeruginosa* a la valeur DO la plus haute ce qui confirme sa grande aptitude pour former un biofilm généralement liée à ses mécanismes de régulation (quorum sensing) et production d'exopolysaccharides.

Les résultats montrent en gros qu'il y a une différence dans la capacité à former un biofilm entre les différentes espèces regardées avec plus souvent des souches qui forment

modérément ou fortement le biofilm ce qui reflète leur potentiel pour s'adapter et survivre dans divers environnements.

3.3.3.2 Inhibition de la formation du biofilm (antiadhérente)

Une diminution de la densité optique traduit une réduction de la formation du biofilm. Les résultats obtenus après traitement par les différents extraits de *P. harmala* L. sont présentés dans le **tableau 17**.

Tableau 17: Effet antibiofilm des extraits de *P. harmala* L. sur différentes souches bactériennes.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>k. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Témoin	0,55±	0,56±	0,61±	0,64±	0,54±	1,04±
	0,04	0,02	0,02	0,05	0,01	0,13
MeOH Macéré	0,28±	0,25±	0,26±	0,19±	0,20±	0,30±
	0,02	0,01	0,03	0,01	0,01	0,07
EtOH Macéré	0,24±	0,21±	0,16±	0,17±	0,18±	0,35±
	0,02	0,02	0,01	0,004	0,01	0,04
EtOH Sous reflux	0,23±	0,22±	0,16±	0,14±	0,16±	0,23±
	0,01	0,01	0,002	0,01	0,01	0,005

Les résultats montrent que les trois extraits de *P. harmala* L. exercent une activité inhibitrice sur la formation du biofilm chez l'ensemble des souches testées. Les pourcentages d'inhibition varient selon la souche bactérienne et le type d'extrait utilisé. Les valeurs les plus élevées ont été observées chez *P. aeruginosa* et *B. cereus*, tandis que les autres souches ont également présenté des taux d'inhibition importants, traduisant une efficacité notable des extraits contre le développement du biofilm bactérien

- Les pourcentages d'inhibition de la formation du biofilm obtenus pour les différents extraits sont présentés dans le **tableau 18**.

Tableau 18: Pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm par les extraits de *P. harmala* L.

souches bactériennes	témoin (DO)	Reflux(%)	EtOH(%)	EMOH(%)
<i>E. coli</i>	0,55	59,09	56	49,27
<i>S. aureus</i>	0,559	60,23	63,32	55,99
<i>M. luteus</i>	0,611	73,32	73,97	57,61
<i>B. cereus</i>	0,638	77,89	74,14	70,22
<i>k. pneumoniae</i>	0,544	71,14	66,18	63,18
<i>P. aeruginosa</i>	1,036	78,09	66,51	71,33

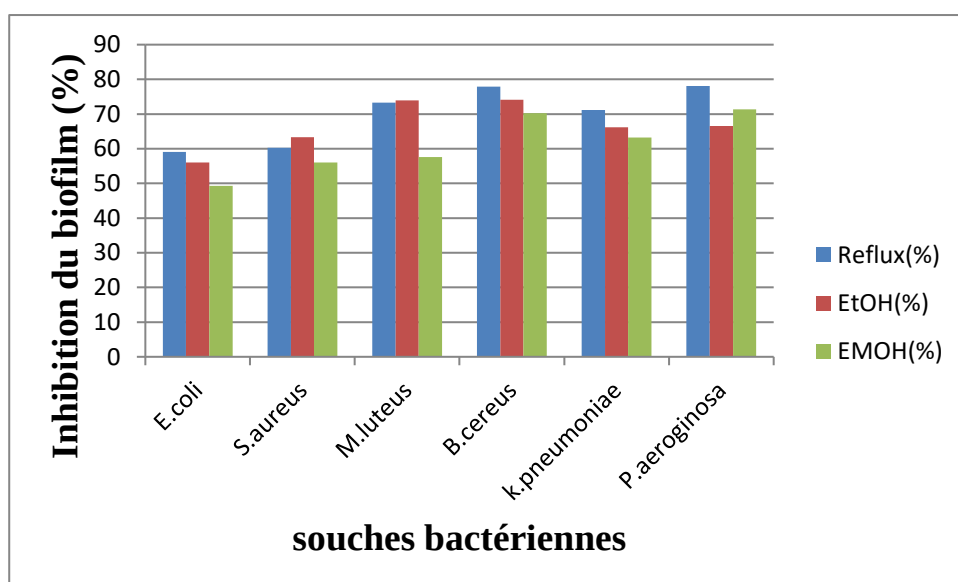


Figure 20: Effet des extraits de *P. harmala* L. sur la formation du biofilm chez les différentes souches bactériennes.

La représentation graphique met en évidence les différences d'efficacité entre les extraits testés. Globalement, les extraits présentent une activité antibiofilm assez marquée contre toutes les souches bactériennes examinées. Les pourcentages d'inhibition les plus élevés ont été notés pour *P. aeruginosa*, *B. cereus*, et *M. luteus*, ce qui confirme que les extraits de *P. harmala* L. peuvent vraiment diminuer, de façon significative, la mise en place du biofilm.

3.3.3.3 Effet des extraits sur un biofilm préformé

L'activité antiadhérente des différents extraits de *P. harmala* L. a été évaluée sur les souches bactériennes testées par la méthode de microplaque. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 19**.

Tableau 19: Effet antibiofilm des extraits de *P. harmala* L. sur des souches bactériennes.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>k. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Témoin	0,22± 0,01	0,16± 0,10	0,61± 0,02	0,37± 0,01	0,31± 0,11	0,30± 0,01
MeOH Macéré	0,05± 0,01	0,08± 0,03	0,16± 0,03	0,24± 0,01	0,17± 0,11	0,22± 0,01
EtOH macéré	0,06± 0,01	0,07± 0,03	0,18± 0,01	0,21± 0,01	0,16± 0,02	0,13± 0,01
EtOH Sous reflux	0,12± 0,01	0,09± 0,04	0,17± 0,01	0,21± 0,01	0,17± 0,02	0,14± 0,01

Les résultats montrent que les extraits de *P. harmala* L. ont une activité antibiofilm qui varie selon la souche bactérienne et le mode d'extraction. En général, tous les extraits ont diminué la formation du biofilm par rapport au témoin, ce qui prouve leur activité antibactérienne.

L'extrait MeOH macéré a montré une activité importante, surtout contre *E. coli* et *M. luteus*, où la DO a baissé d'environ 3/4 par rapport au témoin. Ces résultats sont semblables à ceux rapportés par **Wang et al. (2022)**, qui ont montré une inhibition de l'adhésion bactérienne et du développement du biofilm par les extraits de *P. harmala* L.

L'extrait EtOH macéré s'est révélé le plus actif, avec une diminution de plus de la moitié de la biomasse du biofilm chez *S. aureus*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. Ces observations concordent avec celles de **Valizadeh et al. (2017)** pour *K. pneumoniae* et de **Mirza et al. (2019)** pour *S. aureus* et *P. aeruginosa* qui ont rapporté une inhibition des mécanismes impliqués dans l'adhésion et la formation du biofilm.

Pour *M. luteus*, les trois extraits ont réduit le biofilm d'environ 1/4 par rapport au témoin; cette forte activité pourrait être due aux alcaloïdes de *P. harmala* L., dont l'efficacité contre plusieurs bactéries Gram positif a été démontrée par **Zhu et al. (2022)**.

En général, les extraits obtenus par macération ont montré une meilleure activité que l'extrait EtOH obtenu sous reflux ce qui pourrait s'expliquer par une meilleure conservation des composés bioactifs. Ces résultats confirment donc le potentiel de *P. harmala* L. comme source naturelle antibiofilm molécules.

Conclusion générale

Face à l'augmentation des cas de résistance aux antibiotiques et à la nécessité de trouver de nouvelles alternatives thérapeutiques d'origine naturelle, les plantes médicinales constituent une source prometteuse de molécules bioactives.

Dans ce cadre, cette étude a porté sur *P. harmala* L., une espèce largement utilisée en médecine traditionnelle et reconnue pour sa richesse en métabolites secondaires à fort potentiel biologique. L'objectif principal de ce travail était d'évaluer les activités antimicrobienne, antioxydante et antibiofilm des extraits de graines de *P. harmala* L. obtenus par différentes méthodes d'extraction.

Les résultats obtenus ont montré que le rendement d'extraction varie selon le solvant et la technique utilisée. L'extrait MeOH obtenu par macération a présenté le rendement le plus élevé (21,66 %), suivi de l'extrait EtOH obtenu par reflux (13,00 %) et de l'extrait EtOH obtenu par macération (12,66 %), traduisant une meilleure capacité d'extraction des composés bioactifs pour l'extrait MeOH. Cette observation a été confirmée par le dosage des polyphénols totaux, qui a révélé une teneur significativement plus élevée dans cet extrait ($45,7 \pm 0,59$ mg EAG/g MS). Ces résultats soulignent l'influence déterminante de la nature du solvant sur l'extraction des composés phénoliques.

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH a montré que les extraits possèdent une capacité de piégeage des radicaux libres dépendante de la concentration. Les extraits EtOH ont présenté les activités les plus importantes, avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 50 % aux concentrations les plus élevées testées. Malgré sa richesse en composés phénoliques, l'extrait MeOH a montré une activité antioxydante plus faible, suggérant que d'autres molécules bioactives ou des interactions entre composés pourraient intervenir dans le pouvoir antioxydant des extraits.

Concernant l'activité antimicrobienne, les résultats ont mis en évidence une sensibilité variable des microorganismes testés selon la souche et le mode d'extraction. Les bactéries à Gram positif se sont révélées globalement plus sensibles que les bactéries à Gram négatif. Les espèces *B. cereus*, *B. subtilis* et *M. luteus* ont présenté les plus grandes zones d'inhibition, tandis que *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* se sont montrées les plus résistantes.

L'extrait MeOH obtenu par macération a présenté les meilleures performances globales, notamment contre *B. subtilis* (25 mm), *B. cereus* (23 mm) et *E. coli* (25 mm). Toutefois, l'extrait EtOH macéré a montré une activité particulièrement remarquable contre *M. luteus*,

avec une zone d'inhibition équivalente à celle du témoin antibiotique (30 mm). Bien que les diamètres d'inhibition observés soient restés relativement modestes, ces résultats confirment l'existence d'un potentiel antimicrobien réel des extraits de *P. harmala* L., dont l'intensité dépend de la composition chimique des extraits et de la sensibilité des microorganismes étudiés.

Par ailleurs, les essais antibiofilm ont démontré la capacité des extraits de *P. harmala* L. à perturber les premières étapes du développement des biofilms bactériens en limitant l'adhésion cellulaire et la formation du biofilm. Cette propriété présente un intérêt particulier dans la lutte contre les infections persistantes, où les biofilms constituent un facteur majeur de virulence et de résistance aux traitements conventionnels.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus confirment que les graines de *P. harmala* L. représentent une source naturelle intéressante de composés biologiquement actifs. Malgré des activités variables selon les extraits et les microorganismes étudiés, cette plante possède un potentiel prometteur en tant que source de molécules à activité antioxydante, antimicrobienne et antibiofilm. Ces résultats encouragent la poursuite des recherches visant à valoriser cette espèce dans le développement de nouvelles alternatives naturelles destinées aux domaines pharmaceutique, biomédical et agroalimentaire.

Perspectives

Pour approfondir les connaissances acquises dans ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

- Une caractérisation phytochimiques détaillée des extraits pour identifier les molécules responsables des activités biologiques observées ;
- L'isolement et la purification des principaux composés bioactifs, en particulier les alcaloïdes β -carboliniques et les composés phénoliques ;
- L'étude des mécanismes d'action impliqués dans les activités antioxydante antimicrobienne, et antibiofilm ;
- L'évaluation de l'efficacité des extraits et des molécules isolées sur un plus grand nombre de souches cliniques multirésistantes ;
- La réalisation d'études in vivo permettant d'évaluer l'innocuité, la toxicité et le potentiel thérapeutique réel des extraits ;

- L'exploration des possibilités d'application des extraits de *P. harmala* L. dans les domaines pharmaceutique, agroalimentaire et biomédical.

Les résultats obtenus ouvrent donc des perspectives encourageantes pour la valorisation de *P. harmala* L. comme ressource naturelle à fort potentiel biologique et thérapeutique.

Références bibliographiques

- Abbas, M. W., Hussain, M., Qamar, M., Ali, S., Shafiq, Z., Wilairatana, P., & Mubarak, M. S. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Peganum harmala* extracts: An in vitro and in vivo study. *Molecules*, 26(19), 6084. <https://doi.org/10.3390/molecules26196084>
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(4), 42. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Asgarpanah, J., & Ramezanloo, F. (2012). Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6, 1573–1580.
- Asghari, G., & Lockwood, G. B. (2002). Stereospecific biotransformation of ($\pm$) phenylethyl propionate by cell cultures of *Peganum harmala* L. *Iranian Biomedical Journal*, 6, 43–46.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89(1), 27–36.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 196. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Bardbari, A. M., Arabestani, M. R., Karami, M., Keramat, F., Aghazadeh, H., Alikhani, M. Y., & Bagheri, K. P. (2018). Highly synergistic activity of melittin with antibiotics against multidrug-resistant biofilm-forming *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(3), 443–454. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3189-7>
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493–496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- Baytop, T. (1999). Therapy with medicinal plants in Turkey: Past and present (2nd ed.). Nobel Tıp Kitabevleri.
- Bellakhdar, J. (1997). *La pharmacopée marocaine traditionnelle : médecine arabe ancienne et savoirs populaires*. Ibis Press, Paris, 764 p.

Références bibliographiques

- Benali, F., Boukoussa, B., Benkhedouda, N.-E.-H., Cheddad, A., Issam, I., Iqbal, J., Hachemaoui, M., Abboud, M., & Mokhtar, A. (2022).** Catalytic reduction of dyes and antibacterial activity of AgNPs@Zn@alginate composite aerogel beads. *Polymers*, 14(22), 4829. <https://doi.org/10.3390/polym14224829>
- Blois, M. S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Elahmer, O., Mekhfi, H., & Aziz, M. (2002).** Antihyperglycemic activity of aqueous extract of *Urtica dioica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(2), 243–247.
- Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, 79–82.
- Boucif, O., Benhammou-Belyagoubi, N., Rached-Kanouni, M., Rahab, R. 2023.** Valorisation Phytochimique de *Cupressus sempervirens* L. de la Forêt de Terni (Monts de
- Bournine, L., Bensalem, S., Fatmi, S., Bedjou, F., Mathieu, V., Iguer-Ouada, M., Kiss, R., & Duez, P. (2017).** Evaluation of the cytotoxic and cytostatic activities of alkaloid extracts from different parts of *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae). *European Journal of Integrative Medicine*, 9, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2016.10.002>
- Boussena, A. (2019).** Étude de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales et préparation de l'inoculum bactérien selon la norme McFarland (Mémoire de Master, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Chopra, R. N., Chopra, I. C., Handa, K. L., & Kapur, L. D. (1958).** *Chopra's indigenous drugs of India* (2nd ed.). U. N. Dhur & Sons Pvt. Ltd.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E.H. (1985).** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*. 22(6), 996-1006. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
- Cronquist, A. (1981).** An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press.

Références bibliographiques

- Dahel, I., & Messaoudi, R. (2019).** *Activités biologiques et toxicité des extraits d'une plante médicinale Peganum harmala L.* Mémoire de Master, Université de Bordj Bou Arreridj, Algérie.
- Dehiri, M., Diafat, A., Fatmi, W., Ben Mansour, R., Bouaziz, F., & Bahloul, A. (2022).** *Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities of Peganum harmala L. extracts.* **Biotechnologia Acta**, 15(1), 61–71. <https://doi.org/10.15407/biotech15.01.061>
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., & Kumar, S. (2017).** *Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of Withania somnifera.* **Arabian Journal of Chemistry**, 10(Suppl. 2), S1193–S1199. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02>.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y.-H. (2014).** *Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica.* **Journal of Food and Drug Analysis**, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- El-Bakatoushi, R., & Ahmed, D. G. A. (2018).** *Evaluation of genetic diversity in wild populations of Peganum harmala L., a medicinal plant.* **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 16(1), 143–151.
- El-Ghorab, A. H., Nauman, M., Anjum, F. M., Hussain, S., & Nadeem, M. (2010).** *Peganum harmala: Chemical composition and biological activities.* **Journal of Medicinal Plants Research**, 4(12), 1248–1254.
- Fadl, A. (2018).** Biofilm formation and inhibition assays using microplate method (Mémoire/Thèse non toujours indexée selon versions universitaires).
- Fazal, H., Ahmad, N., Ullah, I., Inayat, H., & Shah, M. A. (2012).** *Antibacterial activity of Peganum harmala L. extracts against selected bacterial strains including Klebsiella pneumoniae.* **Journal of Medicinal Plants Research**, 6(31), 4613–4617. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.530>
- Gayathiri, E., Bharathi, B., Priya, K. 2018.** *Study of the enumeration of twelve clinical important bacterial populations at 0.5 McFarland standards.* **International journal of creative research thoughts**. 6(2): 880-893.
- Hammiche, V., Merad, R., & Azzouz, M. (2013).** Harmel. In *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen* (pp. 137–149). Springer.

Références bibliographiques

- Hakimi Alni, R., Ghorban, K., Dadmanesh, M., Seifi, N., Rashidan, M., & Safdari, H. (2020).** Combined effects of *Allium sativum* and *Cuminum cyminum* essential oils on planktonic and biofilm forms of *Salmonella typhimurium* isolates. *3 Biotech*, 10(7), 315. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02286->
- Harchaoui L. (2019).** Effet antimitotique et cytotoxique des alcaloïdes de la fraction et harmala L. *Esperance. Med.* 101: 5-7.
- Hossain, T. J. (2024).** Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 14(2), 97–115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>
- Iqbal, M. J., Butt, M. S., Sohail, M., & Suleria, H. A. R. (2019).** *The antioxidant potential of black cumin (Nigella sativa L.) extracts through different extraction methods. Current Bioactive Compounds*, 15(6), 623–630
- 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., Delesalle-Féat, T., Biaujeaud, M., Ringuet, J., Bloth, J., & Botrel, A. (2001).** *Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins* (2e éd.). Larousse.
- Jebali, J., Ayed, A., Marzouki, M. N., et al. (2015).** Antibacterial activity of *Peganum harmala* seed extracts against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(6), 90–95.
- Kadeřábková, N., Mahmood, A. J. S., & Mavridou, D. A. I. (2024).** Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. *npj Antimicrobial Resistance*, 2(1), Article 37. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00051-6>
- Kartal, M., Altun, M. L., & Kurucu, S. (2003).** Phytochemical composition and neuroactive properties of *Peganum harmala* seeds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(3), 529–535.
- Karyne, S., et al. (2020).** Biofilm inhibition and removal assays using crystal violet microtiter method (article expérimental en microbiologie).
- Kaskoos, R. A. (2014).** Physico-chemical parameters, phytochemical screening and antioxidant activity of seeds of *Peganum harmala* collected from Iraq. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4(28), 20–24.
- Kaya, E., & Akbaş, P. (2023).** Determination of the antimicrobial, antioxidant activities and fatty acid composition of *Peganum harmala* seed. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 66, e23220237.

- Kemassi, A., Bouziane, N., Boual, Z., & Ould El Hadj, M. D. (2014).** *Activité biologique des huiles essentielles de Peganum harmala L. (Zygophyllaceae) et de Cleome arabica L. (Capparidaceae) sur Schistocerca gregaria (Forskål, 1775).* **Phytothérapie**, 12, 348–353. <https://doi.org/10.1007/s10298-014-0894-y>
- Khadhr, M., Bousta, D., El Hajaji, H., El Mansouri, L., Boukhira, S., Lachkar, M., Jamoussi, B., & Boukhchina, S. (2017).** HPLC and GC–MS analysis of Tunisian Peganum harmala seeds oil and evaluation of some biological activities. *American Journal of Therapeutics*, 24(6), e706–e712. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000402>
- Khadraoui, N., Essid, R., Jallouli, S., Damergi, B., Ben Takfa, I., Abid, G., Jedidi, I., Bachali, A., Ayed, A., Limam, F., et al. (2022).** *Antibacterial and antibiofilm activity of Peganum harmala seed extract against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa pathogenic isolates and molecular mechanism of action.* **Archives of Microbiology**, 204, 133. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02747-z>
- Khozani, R. S., Shahbazzadeh, D., Harzandi, N., Feizabadi, M. M., & Bagheri, K. P. (2019).** Kinetics study of antimicrobial peptide melittin in biofilm degradation of Pseudomonas aeruginosa. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25, 329–338.
- Lamchouri, F., Settaf, A., Cherrah, Y., Hassar, M., Zemzami, M., Atif, N., Nadori, E. B., Zaid, A., & Lyoussi, B. (2000).** *In vitro cell-toxicity of Peganum harmala alkaloids on cancerous cell-lines.* **Fitoterapia**, 71(1), 50–54. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00117-3)
- Lavergne. (2013).** Zygophyllacées. Disponible en format (URL) sur le site : médecine Peganum harmala L. Thèse de Magistère. Université Mohamed El Bachir El médicinales : Identification, préparation, soins (2e éd.). Hong Kong.
- Li, L.-N. (2024).** Peganum harmala L.: A review of botany, traditional use, phytochemistry, pharmacology, quality marker, and toxicity. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 27(6), 797–822. <https://doi.org/10.2174/1386207326666230622164243>
- Li, S., Cheng, X., & Wang, C. (2017).** A review on traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of the genus Peganum. *Journal of Ethnopharmacology*, 203, 127–162. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.049>
- Maire, R. (1933).** Études sur la flore et la végétation du Sahara central. Mémoires de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord.

- Mansour, R. B., Boubaker, J., Bouaziz, M., Skanji, T., & Ghedira, K. (2011).** *Antimicrobial activity of Peganum harmala L. seeds extracts against human pathogenic bacteria.* **Journal of Medicinal Plants Research**, 5(18), 4579–4585
- Mirza, R., Azeem, M., & Qaisar, U. (2019).** Influence of Peganum harmala peptides on the transcriptional activity of biofilm related genes in sensitive and resistant strains of
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2001.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100- S11, Wayne, PA, USA.
- Nenaah, G. (2010).** *Antibacterial and antifungal activities of β -carboline alkaloids of Peganum harmala (L.) seeds and their combination effects.* **Fitoterapia**, 81(7), 779–782
- Niu, C., Afre, S., & Gilbert, E. S. (2006).** Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3671–3680. <https://doi.org/10.1128/AAC.00638-06>
- Nostro, A., Sudano Roccaro, A., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., Cioni, P. L., Procopio, F., & Blanco, A. R. (2007).** Effects of oregano, carvacrol and thymol on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 56(4), 519–523. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46804-0>
- O’Hearn, E., & Molliver, M. E. (1993).** *Degeneration of Purkinje cells in parasagittal zones of the cerebellar vermis after treatment with ibogaine or harmaline.* **Neuroscience**, 55(2), 303–310.
- O’Toole, G. A., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Ozenda, P. (1991).** Flore et végétation du Sahara (3e éd.). Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).
- Quézel, P., & Santa, S. (1963).** Nouvelle flore d’Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris.
- Saada, I. 2023.** Valorisation des ressources biologiques en lutte contre les déprédateurs et les maladies de céréales : cas des extraits de plantes autochtones (Thèse de doctorat). Protection des végétaux. Université Akli Mohand Oulhadj-Bouira.
- Saeedeh, F., Oryan, S., Ahmadi, R., & Eidi, A. (2022).** *Evaluation of chemical components, anti-oxidant properties, and lethal toxicity of alkaloids extracted from Espand (Peganum harmala).* **Journal of Applied Biological Sciences**, 16(2), 257–265. <https://doi.org/10.71336/jabs.971>

- Shahverdi, A. R., Monsef-Esfahani, H. R., Nickavar, B., Bitarafan, L., Khodae, S., & Khoshakhlagh, N. (2005).** *Antimicrobial activity and main chemical composition of two smoke condensates from Peganum harmala seeds.* **Zeitschrift für Naturforschung C**, 60(9–10), 707–710.
- Sheahan, M. C., & Chase, M. W. (1996).** *A phylogenetic analysis of Zygophyllaceae R.Br. based on morphological, anatomical and rbcL DNA sequence data.* **Botanical Journal of the Linnean Society**, 122(4), 279–300.
- Simões, M., Bennett, R. N., & Rosa, E. A. S. (2009).** Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, 26(6), 746–757. <https://doi.org/10.1039/B821648G>
- Soliman, A. M. M., Abu-El-Zahab, H. S., & Alswiai, G. A. (2013).** *Efficacy evaluation of the protein isolated from Peganum harmala seeds as an antioxidant in liver of rats.* **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 6(4), 285–295. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60043-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60043-1)
- Stepanović S., Vuković D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukic S., Ćirković I., & Ruzicka F. (2007).** Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009).** *Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts.* **Molecules**, 14(6), 2167–2180. <https://doi.org/10.3390/molecules14062167>
- Tahri, N., Rhalem, N., & Soulaymani, R. (2004).** *L'intoxication au harmel, Peganum harmala.* **Espérance Médicale**, 10, 5.
- Tahrouch, S., Rapior, S., Mondolot-Cosson, L., Idrissi-Hassani, L. A., Bessière, J. M., & Andary, C. (2002).** *Peganum harmala: source combinée d'arômes et de colorants.* In *Actes de colloque / proceedings* (pp. 33–37).
- The Angiosperm Phylogeny Group. (2016).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Tlemcen). *Revue des BioRessources*. 13, 11-19.
- Valizadeh, N., Valian, F., Sadeghifard, N., Karami, S., Pakzad, I., Kazemian, H., & Ghafourian, S. (2017).** The role of Peganum harmala ethanolic extract and type II toxin-antitoxin system in biofilm formation. *Drug Research*, 67(7), 385–387.

- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006).** Phenolic compound biochemistry. Springer (2nd ed.), 385 p
- Wakeel, A., Jan, S. A., Ullah, I., Shinwari, Z. K., & Xu, M. (2019).** *Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of Isatis tinctoria*. **PeerJ**, 7, e7857. <https://doi.org/10.7717/peerj.7857>
- Wang, N., An, J., Zhang, Z., Liu, Y., Fang, J., & Yang, Z. (2022).** The antimicrobial activity and characterization of bioactive compounds in Peganum harmala L. based on HPLC and HS-SPME-GC-MS. *Frontiers in Microbiology*, 13, 916371.
- Weckesser, W. (2013).** First record of Peganum harmala (Zygophyllaceae) in Val Verde County, Texas, and subsequent eradication treatment. *PhytoNuron*, 2013(71), 1–5.
- Yousefi, R., Ghaffarifar, F., & Dalimi, A. (2009).** *The effect of Alkanna tinctoria and Peganum harmala extracts on Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) in vitro*. **Iranian Journal of Parasitology**, 4(1), 40–47.
- Zhu, Z., Zhao, S., & Wang, C. (2022).** Antibacterial, antifungal, antiviral, and antiparasitic activities of Peganum harmala and its ingredients: A review. *Molecules*, 27(13), 4161.