

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de chimie

Mémoire

Pour obtenir le diplôme de Master en Chimie

Spécialité : Chimie des produits naturels

Intitulé :

**Contribution à l'étude phytochimique et biologique
d'une espèce de la famille des Lamiaceae.**

Présenté Par

Harmazi Aicha

Mekki Khadidja

Devant le jury composé de :

Présidente

Smaili Fatiha / MCA

Université Blida1

Examinatrice

Taleb Meriem / MAA

Université Blida1

Promotrice

Boukaabache. R / MCA

Université Blida1

Promotion : 2024-2025

Résumé

L'étude phytochimique et biologique menée sur *origanum floribundum* Munby, espèce endémique de la flore algérienne, a permis de révéler une richesse significative en métabolites secondaires ainsi qu'un potentiel biologique notable. Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne, des feuilles et des fleurs et a été récolté fin mai et début juin 2024 dans la commune d'Amariya, l'une des communes de la province algérienne de Médéa. L'huile essentielle extraite par hydrodistillation a présenté un rendement élevé de 4,11 %, avec une densité de 0,851, un indice d'acide de 1,456 mg KOH/g, un indice de saponification de 56,1 mg KOH/g et un indice d'ester de 54,644 mg KOH/g, attestant de sa bonne qualité et de sa conformité aux normes AFNOR. Les extraits organiques obtenus par macération ont également affiché de bons rendements, notamment l'extrait chloroformique (31,865 %) et l'extrait méthanolique (10,31 %). Les tests phytochimiques ont mis en évidence la présence de flavonoïdes, de tanins, de terpènes, de stérols, de saponosides et de sucres réducteurs, avec une absence d'alcaloïdes. La quantification des polyphénols totaux a révélé des concentrations de 138,2 mg EAG/g pour l'extrait chloroformique et de 17,275 mg EAG/g pour l'extrait méthanolique. Les flavonoïdes totaux ont été estimés à 16,9 mg EQ/g pour l'extrait chloroformique et à 7,64 mg EQ/g pour l'extrait méthanolique. L'activité antioxydante, exprimée par la valeur IC_{50} , a été faible avec 0,392 mg/ml pour l'huile essentielle et 1,46 mg/ml pour l'extrait chloroformique, contre 0,0147 mg/ml pour la vitamine C utilisée comme référence. Sur le plan antibactérienne, l'huile essentielle a démontré une forte activité contre les bactéries Gram positives (*S. aureus*, *E. faecalis*) avec une CMI de 0,039 mg/ml, mais une efficacité réduite contre les Gram négatives (*P. aeruginosa* : 2,5 mg/ml ; *E. coli* > 10). L'extrait chloroformique a également montré une bonne efficacité contre *S. aureus* (CMI = 0,1562 mg/ml), tandis que l'extrait méthanolique s'est révélé le moins actif. L'ensemble de ces résultats confirme que *o. floribundum* représente une source prometteuse de composés bioactifs aux applications potentielles en pharmacologie, cosmétique et agroalimentaire. Sa valorisation pourrait également contribuer au développement local durable en Algérie, en particulier dans les régions où elle est naturellement présente.

Mots clés: *Origanum floribundum* Munby, *Lamiaceae*, huile essentielle, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

The phytochemical and biological study conducted on *Origanum floribundum* Munby, an endemic species of the Algerian flora, revealed a significant richness in secondary metabolites and notable biological potential. The plant material, consisting of the aerial parts, leaves, and flowers, was collected in late May and early June 2024 in the commune of Amariya, one of the municipalities in Médéa Province, Algeria. The essential oil extracted by hydrodistillation showed a high yield of 4.11%, with a density of 0.851, an acid index of 1.456 mg KOH/g, a saponification index of 56.1 mg KOH/g, and an ester index of 54.644 mg KOH/g, indicating good quality and compliance with AFNOR standards. Organic extracts obtained by maceration also displayed good yields, particularly the chloroform extract (31.865%) and the methanolic extract (10.31%). Phytochemical tests revealed the presence of flavonoids, tannins, terpenes, sterols, saponins, and reducing sugars, with the absence of alkaloids. The quantification of total polyphenols revealed concentrations of 138.2 mg GAE/g for the chloroform extract and 17.275 mg GAE/g for the methanolic extract. Total flavonoids were estimated at 16.9 mg QE/g for the chloroform extract and 7.64 mg QE/g for the methanolic extract. The antioxidant activity, expressed by the IC₅₀ value, was low, with 0.392 mg/ml for the essential oil and 1.46 mg/ml for the chloroform extract, compared to 0.0147 mg/ml for vitamin C used as a reference. Antibacterial tests showed strong activity of the essential oil against Gram-positive bacteria (*S. aureus*, *E. faecalis*) with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.039 mg/ml, but reduced efficacy against Gram-negative bacteria (*P. aeruginosa*: 2.5 mg/mL; *E. coli* > 10). The chloroform extract also showed good efficacy against *S. aureus* (MIC = 0.1562 mg/ml), while the methanolic extract was the least active. These results confirm that *O. floribundum* represents a promising source of bioactive compounds with potential applications in pharmacology, cosmetics, and the food industry. Its valorization could also contribute to sustainable local development in Algeria, particularly in the regions where it naturally occurs.

Keywords :

Origanum floribundum Munby, *Lamiaceae*, essential oil, antioxidant activity, antibacterial activity.

الملخص

الدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية التي أجريت على نبات *Origanum floribundum* Munby، وهو نوع متوطن في الغطاء النباتي الجزائري، كشفت عن غنى كبير بالمركبات الثانوية وإمكانات بيولوجية ملحوظة. يتكون الجزء النباتي المستخدم من الأجزاء الهوائية، الأوراق والزهور، وقد تم جمعه في أواخر ماي وبداية جوان 2024 في بلدية عمارية، إحدى بلديات ولاية المدية الجزائرية. أظهرت الزيوت الأساسية المستخلصة بالتقطير بالماء نسبة مردود مرتفعة بلغت 4.11٪، بكثافة 0.851، مؤشر حمضي قدره 1.456 ملغ/كOH غ، مؤشر تصبب 56.1 ملغ/كOH غ، ومؤشر إستر بلغ 54.644 ملغ/كOH غ، مما يدل على جودتها العالية وتوافقها مع معايير AFNOR. كما أظهرت المستخلصات العضوية المحصلة بالتقطيع مردودًا جيدًا، خاصة المستخلص الكلوروفورمي (31.865٪) والمستخلص الميثانولي (10.31٪). أظهرت الاختبارات الفيتوكيميائية وجود الفلافونويدات، التانينات، التربينات، الستيرويدات، السابونينات والسكريات المختزلة، مع غياب القلويدات. كشفت عملية تحديد كمية البوليفينولات الكلية عن تركيزات بلغت 138.2 ملغ مكافئ حمض الغاليك/غ في المستخلص الكلوروفورمي و17.275 ملغ/غ في المستخلص الميثانولي. أما الفلافونويدات الكلية، فقد قُدرت بـ 16.9 ملغ مكافئ كيرسيتين/غ للمستخلص الكلوروفورمي و7.64 ملغ/غ للمستخلص الميثانولي. أما النشاط المضاد للأكسدة، المعبر عنه بقيمة IC_{50} ، فقد كان ضعيفًا، إذ بلغ 0.392 ملغ/مل للزيت الأساسي و1.46 ملغ/مل للمستخلص الكلوروفورمي، مقارنة بفيتامين C (0.0147 ملغ/مل) المستخدم كمرجع. بيّنت الدراسة أيضًا أن الزيت الأساسي يتمتع بنشاط قوي ضد البكتيريا إيجابية الغرام (مثل *S. aureus* و *E. faecalis* بتركيز مثبط أدنى (CMI) قدره 0.039 ملغ/مل، بينما كان أقل فعالية ضد البكتيريا سالبة الغرام (2.5 : *P. aeruginosa*) ملغ/مل؛ ($E. coli > 10$). كما أظهر المستخلص الكلوروفورمي فعالية جيدة ضد *S. aureus* (CMI = 0.1562 ملغ/مل)، بينما كان المستخلص الميثانولي الأقل نشاطًا. تؤكد هذه النتائج أن *Origanum floribundum* يُعد مصدرًا واعدًا للمركبات النشطة بيولوجيًا ذات تطبيقات محتملة في مجالات الصيدلة، والتجميل، والصناعات الغذائية. كما أن استغلاله قد يساهم في التنمية المحلية المستدامة في الجزائر، خاصة في المناطق التي يتواجد بها طبيعيًا.

الكلمات المفتاحية:

Origanum floribundum Munby، فصيلة الشفوية (Lamiaceae)، زيت أساسي، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للبكتيريا.

Remerciement

Au terme de ce parcours universitaire, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Nous remercions tout d'abord Allah, le Tout-Puissant, de nous avoir accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce parcours.

Nous souhaitons exprimer notre sincère reconnaissance à **Monsieur El Hattab**, notre enseignant, pour sa pédagogie exemplaire et son soutien constant tout au long de nos études. Son expertise et sa bienveillance ont grandement enrichi notre parcours académique.

Notre gratitude va également à **Madame Boukaabache Rabiaa**, promotrice de ce travail, pour sa disponibilité, ses conseils précieux et son accompagnement rigoureux, qui nous ont permis d'achever ce projet avec sérénité.

Nous remercions chaleureusement **Madame Smaili Fatiha**, présidente du jury, ainsi que **Madame Taleb Meriem**, examinatrice, pour avoir accepté d'évaluer ce modeste travail de fin d'études.

Enfin, nous tenons à remercier l'ensemble des enseignants qui nous ont accompagnés durant ces cinq années. Leur engagement, leur savoir et leurs encouragements ont été des piliers essentiels de notre réussite. À toutes et à tous, nous adressons nos remerciements les plus sincères.

Dédicace

Louange à Allah, au commencement et à la fin, intérieurement et extérieurement. C'est par sa grâce que j'ai été guidée, soutenue et fortifiée tout au long de ce parcours. Je dédie humblement ce travail à ceux qui occupent une place centrale dans mon cœur : ma famille bien-aimée, mon soutien dans cette vie.

À ma mère chérie, **Aïcha**, source d'amour, de tendresse et de prières sincères puisse Allah te protéger et te récompenser pour tout ce que tu m'as donné. À mon père, que j'estime profondément, pour sa sagesse, sa présence et ses encouragements constants.

À mon grand frère, **Walid**, mon véritable pilier. Malgré ton absence physique, tu étais avec moi à chaque instant. Tu as été mon soutien silencieux, ma force dans l'ombre. Qu'Allah te garde et fasse que je sois toujours une source de fierté pour toi.

À mes frères et sœurs, en particulier **Meriem** et ses enfants : **Akram, Wassim et Mohamed**, ainsi qu'à mon frère **Ishak**, votre amour et vos prières m'ont portée jusqu'ici.

Un merci tout spécial à mes précieuses amies, qui ont partagé avec moi les moments de joie comme de difficulté, en particulier **Faïza**. Et mes amis **Chaima, Hadjer, Imen, Abir** À vous tous, je dis du fond du cœur : je vous aime énormément.

À ma chère amie et bien-aimée **Aïcha**, Les mots me manquent pour exprimer toute ma gratitude pour les moments partagés, les efforts communs, les nuits de travail, les éclats de rire et les réussites vécues ensemble. Tu as été mon soutien, ma motivation et ma complice tout au long de ce parcours. Ta présence à mes côtés a rendu cette expérience plus douce, plus humaine, et infiniment plus précieuse. Merci du fond du cœur pour ton esprit généreux, ton amitié sincère, ton aide inestimable et pour chaque instant que nous avons passé ensemble à réaliser ce mémoire. Ce chemin que nous avons parcouru restera gravé dans ma mémoire avec tendresse et reconnaissance. Et me voici aujourd'hui, prononçant mes derniers mots en tant qu'étudiante, vous disant au revoir sur une note de gratitude, avec la fierté de mon diplôme et de ma réussite.

Qu'Allah bénisse cette étape et qu'Il m'accorde le succès dans ce qui vient.

Mekki Khadidja.

Dédicace

À ma mère chérie, **Louiza,**

Source inépuisable d'amour et de tendresse, tu as été mon refuge dans les moments de doute, et ma force dans les moments d'épuisement. Tes prières silencieuses m'ont portée plus loin que je ne l'aurais cru possible. Ce succès est le tien avant d'être le mien.

À mon père bien-aimé, **Omar,**

Toi qui m'as appris la patience, l'endurance et la confiance, merci pour ton soutien sans faille, tes conseils sages et ta présence rassurante. Je te dédie chaque pas que j'ai franchi sur ce chemin.

À mes chères sœurs, **Meriem, Sara, hadjer,**

Vous avez été ma motivation, ma joie et ma force. Merci pour votre affection, votre patience et vos encouragements constants. Vous avez rendu ce parcours plus doux.

À mes précieuses amies, **Hawaa, Meriem, Faiza, Chaima, Imen, Hadjer.**

Merci pour votre présence fidèle, vos sourires, votre écoute, et votre soutien dans les bons et les mauvais jours. Grâce à vous, cette aventure a été plus belle, plus vivante, plus humaine.

À ma chère amie et bien-aimée **khadidja,**

Les mots me manquent pour exprimer toute ma gratitude pour les moments partagés, les efforts communs, les nuits de travail, les éclats de rire et les réussites vécues ensemble. Tu as été mon soutien, ma motivation et ma complice tout au long de ce parcours. Ta présence à mes côtés a rendu cette expérience plus douce, plus humaine, et infiniment plus précieuse. Merci du fond du cœur pour ton esprit généreux, ton amitié sincère, ton aide inestimable et pour chaque instant que nous avons passé ensemble à réaliser ce mémoire. Ce chemin que nous avons parcouru restera gravé dans ma mémoire avec tendresse et reconnaissance.

Je vous dédie cette réussite avec tout mon amour et ma reconnaissance. Vous êtes tous une partie de ce rêve accompli.

Avec un cœur rempli de gratitude,

Harmazi Aïcha.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

CHAPITRE I : Revue bibliographique

Partie 1 : Généralités sur l'origan

I.1. La famille des <i>Lamiacées</i>	3
I.2. Le genre <i>origan</i> : <i>Origanum floribundum</i> Munby.....	3
I.3. Historique de genre d' <i>origan</i>	4
I.4. Espèces principales d' <i>origan</i>	4
I.5. Description botanique	6
I.6. Répartition géographique	6
I.7. Classification dans la systématique botanique	8
I.8. Les huiles essentielles	8
I.9. Répartition botanique des huiles essentielles	9
I.10. Conservation des huiles essentielles	9
I.11. Propriétés physiques des huiles essentielles	9
I.12. Notion de chémotype	10
I.13. Utilisation traditionnelle.....	11
I.13.1. Usages médicaux et thérapeutiques	11
I.13.2. Usages culinaires	12
I.13.3. Utilisations industrielles et cosmétiques	12

Partie 2 : Etude antérieures de genre *origanum*

I.1. Étude de la composition chimique d'huile essentielle d' <i>Origan</i>	12
--	----

I.2. Activités biologiques de l'huile essentielle <i>d'Origan</i>.....	15
I.2.1. Activités antioxydantes.....	15
I.2.2. Activités antibactérienne.....	16
Conclusion.....	17

CHAPITRE II : Partie expérimentale

II.1. Introduction	18
II.2. Site de prélèvement	19
II.3. Préparation de plante	19
II.4. Etude phytochimique	20
II.4.1. Extraction des huiles essentielles (HE)	20
II.4.2. Méthode d'extraction (Macération à froid)	21
II.4.3. Caractéristiques physico- chimiques des huiles essentielles	23
II.4.4. Screening phytochimique	25
II.5. Quantification des composés phénoliques	28
II.5.1. Dosage des polyphénols totaux	28
II.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux	30
II.6. Les activités biologiques	32
II.6.1. Évaluation Activité antioxydante	32
II.6.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne	34

CHAPITRE III : Résultats et discussions

III. Etude phytochimique.....	36
III.1. Détermination du rendement d'extraction	36
III.2. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles	37

III.2.1. Caractéristiques physique.....	37
III.2.2. Caractéristiques chimique	37
III.3. Screening phytochimique	39
III.4. Quantification des composés phénoliques	42
III.4.1. Dosage des polyphénols totaux	42
III.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux	44
III.5. Les activités biologiques	47
III.5.1. Activité antioxydante	47
III.5.1. Activité antibactérienne	50
Conclusion	52
Références bibliographique.....	54
Annexe.....	60

LISTE DES FIGURES

Figure I.1. : Aire de distribution du genre <i>origanum</i> (Ietswaart, 1980).....	7
Figure I.2. : Structures de quelque composé chimique d'espèce d' <i>Origanum</i> <i>Floribundum</i>	15
Figure II.1 : Diagramme générale de la procédure expérimentale.....	18
Figure II.2 : Carte géographique de l'emplacement de la plante étudiée.....	19
Figure II.3 : La plante étudiée (fraiche et sèche).....	20
Figure II.4 : Hydrodistillation (type Clevenger).....	21
Féfigure II.5 : Méthode d'extraction (Macération à froid).....	22
Figure II.6 : Pycnomètre.....	24
Figure II.7 : L'extrait préparer (eau /MeOH).....	25
Figure II.8. Le protocole de dosage des polyphénols.....	30
Figure II.9 : Le protocole de dosage des flavonoïdes.....	31
Figure II.10 : La réduction du DPPH.....	32
Figure III.1 : Résultat de screening pytochimique de plante <i>Origanum</i> <i>floribudum</i>	40
Figure III.2 : Courbe d'étalonnage des pholyphénol toutaux.....	42
Figure III.3 : Les histogrammes de la quantité en (mg EAG /ml) des polyphénols dans deux extraits.....	43
Figure III.4 : Courbe d'étalonnage de quercétine totaux.....	44
Figure III.5 : Les histogrammes de la quantité en (mg EQ /ml) des flavonoïdes dans deux extraits	45

Figure III.6 : Le lecteur ELISA et microplaque utilisé pour activité antioxydante.....	47
Figure III.7 : Courbe du pourcentage d'inhibition du DPPH par l'acide ascorbique.	48
Figure III.8 : Courbe du pourcentage d'inhibition Du DPPH par l'extrait chloroformique et par l'HE.....	48
Figure III.9 : Résultats dans la microplaque d'activité antibactérienne.....	50

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Les espèces principales <i>d'origan</i>	4
Tableau I.2 : Classification de plante <i>origanum floribundum</i>	8
Tableau I.3 : Les principaux chémotypes d' <i>origanum floribundum</i> identifiés dans différentes régions d'Algérie	11
Tableau I.4 : Composition chimique majoritaires de l'huile essentielle d'espèces <i>d'origan</i>	14
Tableau II.1 : Les souches bactériennes utilisé dans cette étude.....	35
Tableau III.1 : Rendement d'extraction d'HE.....	36
Tableau III.2 : Rendement d'extrait des extraits.....	37
Tableau III.3 : Résultat de screening pytochimique de plante <i>Origanum floribudum</i>	41
Tableau III.4 : Résultats des absorbances obtenues pour les différentes concentrations standards d'acide gallique.....	42
Tableau III.5 : Résultats des absorbances obtenues pour les différentes concentrations standards de quercitrine.....	44
Tableau III.6 : Les valeurs d'absorbance obtenues ainsi que les PI% en fonction des concentrations croissantes d'acide ascorbique.....	48
Tableau III.7 : Les valeurs de PI% en fonction des concentrations croissantes d'HE et extrait chloroformique.....	48
Tableau III.6 : les valeurs correspondant à 50 % d'inhibition d'extrait chloroformique et de l'HE et du standard.....	48
Tableau III.7 : Résultats d'activité antibactérienne.....	50

ABRIVIATIONS

HE : Huiles essentielles.

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

BHT : l'hydroxytoluène butylé.

FTIR : infrarouge à transformée de Fourier.

CMI : concentration minimale d'inhibition.

IC₅₀ : la valeur correspondant à 50 % d'inhibition.

PI% : pourcentage d'inhibition.

Ia : indice d'acide.

Is : indice de saponification.

Ie : indice d'ester.

EAG : équivalent d'acide gallique.

EQ : équivalent de quercétine.

Introduction Générale :

On compte environ 2000 plantes utilisées en herboristerie. Jusqu'à l'avènement de la chimie moderne (extraction, synthèse), les plantes ont été l'une des principales, sinon la principale, ressources de la pharmacopée utilisée par les différentes civilisations. Elles font historiquement partie de la médecine et restent des éléments de base de la chimiothérapie moderne. Dans son ensemble, une plante constitue un ensemble riche et complexe, composé de parties aériennes (feuilles, fruits, fleurs...) et de parties souterraines (racines, rhizomes...). Elle peut contenir une ou plusieurs substances actives, chacune ayant ses propres indications et méthodes de préparation. La recherche en phytothérapie sélectionne les plantes les plus actives et les plus efficaces pour lutte contre les maladies [1]. Limitation des effets indésirables, dosimétrie des principes actifs stabilisés. Avec ces méthodes, la pharmacognosie ouvre la porte à de nouvelles utilisations issues des végétaux, par exemple dans la lutte contre les cancers [2]. L'Algérie, de par sa position géographique, bénéficie de plusieurs facteurs pédoclimatiques et de ressources hydriques favorables au développement des plantes spontanées, notamment les plantes médicinales [3].

De nombreux auteurs ont tenté de définir ce qu'est une huile essentielle. Selon l'Association Française de Normalisation (AFNOR), une huile essentielle est définie comme un produit obtenu à partir d'une matière première naturelle d'origine végétale, soit par distillation à l'eau ou à la vapeur, soit à partir du péricarpe des fruits des espèces citrus par un procédé mécanique, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des moyens physiques (décontamination). Les huiles essentielles (ou essences, huiles volatiles, huiles éthérées, ou aetheroleum) sont des mélanges naturels complexes de substances volatiles, lipophiles et odorantes que l'on retrouve dans les plantes aromatiques. La plupart des huiles essentielles sont incolores ou jaune pâle, liquides à température ambiante et moins denses que l'eau. Les constituants chimiques des huiles essentielles sont de faible poids moléculaire, parfois optiquement actifs, solubles dans la plupart des solvants organiques (éther, alcool, acétone), mais insolubles dans l'eau [4].

Nous avons formulé notre problématique de recherche afin d'identifier de nouvelles molécules présentant des activités biologiques, en nous basant sur la biodiversité végétale algérienne. Malgré son importance, peu d'espèces végétales ont été étudiées sur le plan chimique. Cela augmente les possibilités de découvrir de nouveaux métabolites actifs ou d'observer de nouvelles activités sur des composés déjà connus. C'est dans cette perspective que se situe

notre recherche, qui se concentre sur l'analyse d'une espèce du genre *origanum*, en s'appuyant sur l'endémisme et les propriétés médicinales. La conception de cette présentation de mémoire est la suivante : Le premier chapitre propose une revue bibliographique qui condense les principaux aspects des espèces choisies de la famille des *Lamiaceae*. Il inclut une présentation systématique de l'espèce *origanum floribundum*, ses propriétés thérapeutiques et ses composants actifs, suivie d'une analyse des recherches antérieures sur *origanum floribundum*. Le chapitre suivant se concentrera sur les recherches expérimentales, qui incluent l'analyse phytochimique, l'extraction et l'extraction des huiles essentielles (hydrodistillation), la quantification des polyphénols et des flavonoïdes ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH) des extraits et des huiles essentielles, ainsi que l'appréciation de l'effet antibactérien des divers extraits et de l'huile essentielle de notre plante. Le dernier chapitre compile les diverses observations et la discussion des résultats obtenus. Nous concluons notre étude par une conclusion et mettent en lumière les perspectives futures de recherche dans ce domaine.

CHAPITRE I

Revue bibliographique

Partie 1 : Généralités sur l'origan

I.1. La famille des *Lamiaceae* :

La famille des *Lamiaceae*, également connue sous le nom de Labiées, est une famille importante de plantes à fleurs dicotylédones. Elle tire son nom du latin "labium", qui signifie "lèvre", en raison de la caractéristique commune de la forme des corolles de ces plantes. Les *Lamiaceae* constituent une famille très diversifiée avec 224 genres et environ 4000 espèces. Elle est aussi bien répandue dans les zones tropicales que dans les zones tempérées du monde. Elle est bien représentée dans la flore d'Algérie avec 183 taxons dont 19 endémiques. Elle arrive en quatrième position après les *Asteraceae* (557 taxons), les *Poaceae* (456 taxons) et les *Fabaceae* (455 taxons) [5], avec 27 genres et 140 espèces. La famille des *Lamiaceae* est très homogène et assez facile à reconnaître sur la base des critères suivants [6] : Il s'agit le plus souvent de plantes herbacées, mais elles peuvent être ligneuses et prendre la forme d'arbrisseaux ou de sous-arbrisseaux comme le romarin (*Rosmarinus officinalis*) et l'origan (*Origanum floribundum*). Elles sont connues pour leur utilisation variée, tant en cuisine qu'en parfumerie ou en pharmacie, comme la ballote, la lavande, la marjolaine et la mélisse. C'est une grande famille très typique du monde végétal, qui possède une importance économique due à sa richesse en huiles essentielles [7].

I.2. Le genre *origan* :



Le genre *Origanum*, appartenant à la famille des *Lamiaceae*, est reconnu pour sa richesse en propriétés médicinales. De plus, il se caractérise par un grand nombre d'activités biologiques, notamment antimicrobiennes, antifongiques, antioxydantes et insecticides, qui présentent des bienfaits pour la santé humaine. Ce genre comprend environ 42 espèces largement réparties autour de la Méditerranée. Notre étude s'est intéressée à *origanum floribundum* Munby, l'une des deux espèces présentes en Algérie. Selon la taxonomie d'*origanum* établie par *origanum floribundum* Munby est classé dans la section *Elongaspica* [8]. Cette espèce spontanée est rare et endémique du centre-nord de l'Algérie ; elle se caractérise systématiquement par des épis lâches et délicats, des calices tubulaires à cinq dents égales, ainsi que par des tiges prostrées à la base. En médecine traditionnelle, elle est utilisée comme expectorant et contre la toux, ainsi que comme herbe culinaire par la population locale. Des études antérieures ont montré que l'huile essentielle de cette espèce est riche en composés phénoliques et possède des activités biologiques [9].





I.3. Historique de genre d'*origan* :

Le nom de genre *Origanum* vient du grec Origanon, qui serait la réunion des termes Oros (montagne) et ganos (brillant), faisant allusion au fait que la plante scintille sur la montagne. *Floribundum* signifie très florifère [10]. L'utilisation de l'*origan* a été médicinale avant d'être culinaire. Les Grecs utilisaient les feuilles pour soulager les muscles douloureux. Les Romains le prenaient pour apaiser les morsures de serpents ou de scorpions. Aristote et Hippocrate recommandaient déjà l'*origan* pour ses effets contre les maladies respiratoires, les brûlures et les problèmes de digestion [11]. L'*origan* est un genre de plantes aromatiques appartenant à la famille des Lamiacées. Il comprend environ 40 espèces réparties principalement en Méditerranée et en Asie occidentale. Voici quelques espèces notables d'*origan* :

I.4. Espèces principales d'*origan* :

Tableau I.1 : Les espèces principales d'*origan*.

Espèce	Nom commun	Répartition géographique	Utilisation	Référence
<i>Origanum vulgare</i> 	<i>Origan commun</i>	Europe, Asie tempérée.	Aromatique, médicinal (antiseptique, digestif)	[12]
<i>Origanum majorana</i> 	<i>Marjolaine</i>	Méditerranée orientale	Culinaire, anti-inflammatoire.	[13]

<i>Origanum dictamnus</i> 	<i>Dittany de Crète</i>	Crète (Grèce)	Infusions médicinales, antioxydant	[14]
<i>Origanum syriacum</i> 	<i>Origan syrien / Za'atar</i>	Moyen-Orient (Liban, Syrie, phalestine)	Alimentaire (za'atar), médicinal	[15]
<i>Origanum onites</i> 	<i>Origan turc</i>	Turquie, Grèce.	Huile essentielle (carvacrol).	[16]
<i>Origanum floribundum</i> 	<i>Origan florifère</i>	Nord de l'Algérie (endémique).	Médicinal, insecticide naturel.	[17]

I.5. Description botanique :

L'origan est un sous-arbrisseau vivace de 30 à 50 cm de hauteur, implanté sur les pentes escarpées du bassin méditerranéen. Faisant partie de la famille des *Lamiaceae*, il est très proche de la marjolaine, avec laquelle il partage les mêmes propriétés. Ses rameaux rougeâtres, carrés, portent de petites feuilles duveteuses à la forme ovoïde se terminant en pointe. Ses fleurs vont du blanc au mauve selon les espèces [18]. Les caractères morphologiques végétatifs de *Origanum floribundum* (espèce vivace herbacée, aromatique médicinale et condimentaire) se caractérisent par :

- **La tige :** prostrée à la base, les jeunes sont décombantes, dressées, grêles et à section carrée, quadrangulaires et de courts rameaux à l'aisselle sont de couleur verdâtre.
- **La racine :** est un rhizome (tige souterraine) ligneux avec des rejets filamenteux (racines adventives), ce qui lui confère une bonne accroche (d'où son abondance dans les zones de hautes altitudes).
- **Les feuilles :** sont ovales, pétiolées à bord peu denté, opposées et de taille variable, les feuilles inférieures étant plus grandes.
- **Les fleurs :** sont hermaphrodites ; elles s'organisent en épis lâches (inflorescence indéfinie), disjointes après la floraison. Le calice a 5 dents courtes ; la corolle présente des lèvres sensiblement égales, plutôt régulières.
- **Le fruit :** est un tétrakène, ovoïde et lisse, de couleur noirâtre [19].

I.6. Répartition géographique :

- **En Algérie :**

Origanum floribundum est une espèce endémique de l'Algérie, où elle est rare dans l'Atlas tellien et en grande Kabylie. Le genre *origanum*, appelé communément « Zaàtar » en Algérie, appartient à la famille des *Lamiaceae* et est originaire du sud-est méditerranéen et de l'Asie occidentale. Il compte 46 taxons sur le pourtour méditerranéen. En Algérie, il est représenté par deux espèces spontanées phylogénétiquement proches : *origanum glandulosum* Desf, endémique algéro-tunisienne, et *origanum floribundum*, localisé dans le secteur de l'Atlas blidéen et celui de la grande Kabylie [19].

- **Dans le monde :**

Le genre *origanum* appartient à la famille des *Lamiacées* et se concentre à environ 75% dans la région méditerranéenne, en particulier dans les régions orientales. L'origan pousse surtout dans les pays méditerranéens, ainsi que dans de nombreux pays d'Europe et d'Asie [20]. Parmi les 49 taxons, 13 espèces sont classées comme rares, dont *origanum floribundum* d'Algérie. La culture de cette plante aromatique a lieu principalement en Espagne, dans le bassin méditerranéen, mais également en Italie, en Inde, au Mexique et aux États-Unis. Très répandue en Europe et en Asie dans les prés secs ou les pentes arides jusqu'à 2000 m, les espèces courantes, plus ou moins communes dans le Tell, sont *origanum glandulosum* Desf. (Espèce nord - africaine : Algérie, Tunisie), *o. hirtum* Batt. (Espèce nord -africaine), *O. compactum* Benth (espèce ouest méditerranéenne) et *o. floribundum* (espèce endémique). Les trois espèces du genre *origanum* présentes en Algérie se trouvent toutes en Kabylie :

-*Origanum glandulosum* Desf. (= *origanum compactum* Benth).

- *Origanum majorana*, est méditerranéenne ; elle est souvent nommée merdgouch, cultivée et plus ou moins subspontanée.

- *Origanum floribundum*, endémique, est présente en Algérie, où elle est rare dans l'Atlas tellien et en grande Kabylie ; on les trouve dans les pâturages, tant en montagne [21].



Figure I.1. : Aire de distribution du genre *origanum* [8].

I.7. Classification dans la systématique botanique :

Selon la classification classique des plantes, le serpolet suit la classification suivante :

Tableau I.2 : Classification de plante *origanum floribundum*.

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Trancheobionta</i>
Embranchement	<i>Spermaphyta</i>
Sous embranchement	Angiosperme
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	<i>Lamiaceae (Labiataea)</i>
Genre	<i>Origanum</i>
Espèce	<i>Origanum floribundum</i>

I.8. Les huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des extraits naturels dérivés de diverses parties des plantes aromatiques, telles que les fleurs, les feuilles, les écorces ou les racines, obtenus par des méthodes comme la distillation à la vapeur ou le pressage à froid. Elles renferment des principes actifs concentrés qui leur attribuent des propriétés diverses, employées depuis des siècles en médecine traditionnelle, en aromathérapie et dans les cosmétiques. Chaque huile essentielle possède des avantages particuliers : par exemple, l'huile de lavande est connue pour ses effets relaxants sur le stress et le sommeil, alors que l'huile de menthe poivrée est énergisante, aidant la digestion et atténuant les maux de tête. L'huile de citron est réputée pour ses effets dynamisants et nettoyants, tandis que l'huile d'arbre à thé est largement employée pour ses qualités antiseptiques et purificatrices sur la peau. Ces huiles peuvent être employées de diverses manières, telles que l'inhalation, l'application sur la peau après dilution dans une huile végétale, ou en les incorporant à l'eau du bain pour une expérience apaisante.

Néanmoins, leur emploi doit se faire avec précaution, car certaines huiles peuvent provoquer des irritations ou être déconseillées aux femmes enceintes, aux enfants ou aux personnes vulnérables [22].

I.9. Répartition botanique des huiles essentielles :

Parmi les 800.000 espèces de la flore, seules 10% sont considérées comme aromatiques et aptes à produire une essence [23]. Elles se classent dans plusieurs familles, notamment : *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae* et *Piperaceae* [24]. Les huiles essentielles se trouvent dans tous les organes de la plante : fleurs (Origan et Menthe), écorce (Cannelier), racines (Vétiver), rhizomes (Gingembre), fruits (Anis, Fenouil et Bardianier) et bois (Camphrier). La concentration d'une substance en huile essentielle est habituellement faible, se situant entre 1% et 1‰. Cependant, il y a certaines plantes avec une concentration en essence dépassant 5%, comme la Badiane de Chine. Le Clou de Girofle, pour sa part, contient plus de 15% d'huile essentielle [25]. Les huiles essentielles se forment dans le cytoplasme des cellules qui sécrètent. Elles sont conservées dans des cellules modifiées en cellules glandulaires, dans des poils glands, des cavités sécrétrices ou des voies sécrétrices [26].

I.10. Conservation des huiles essentielles :

Par nature, l'HE est très volatile, instable et fragile ; elle doit être conservée à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'air, car elle s'oxyde facilement. Elle se conserve dans un flacon propre et sec en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté antiactinique. Le flacon doit être presque entièrement rempli et fermé de manière étanche (l'espace libre étant occupé par de l'azote ou un autre gaz inerte) [24].

I.11. Propriétés physiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles forment un groupe homogène caractérisé par des propriétés physiques spécifiques.

- À température ambiante, elles se présentent généralement sous forme liquide, à l'exception de certaines comme la myrrhe et le santal, qui peuvent être visqueux, ou encore la rose et le camphrier, susceptibles de se cristalliser [27].

- Les huiles essentielles se caractérisent par une volatilité élevée, liée à leur nature odorante, ce qui les distingue des huiles fixes. Cette propriété permet leur extraction par entraînement à la vapeur. Leur couleur est généralement incolore à jaune pâle, bien qu'il existe des exceptions. Par exemple, l'huile essentielle de camomille romaine (*Anthemis nobilis*) présente une teinte bleu clair, due à la présence d'un composé appelé chamazulène [28].
- Leur densité est, le plus souvent, inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau : ce sont les HE de sassafras, de cannelle et de giroflier. La densité de l'huile essentielle d'origan varie généralement entre 0,900 et 1,000 g/mL, selon les conditions spécifiques de la plante et du processus d'extraction [29].
- Peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent cependant leur odeur (eaux distillées aromatiques) ; elles sont solubles dans les alcools à titre élevé (différences avec les lipides), solubles dans les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques, elles sont liposolubles [30].
- Point d'ébullition : Le point d'ébullition de l'huile essentielle d'origan est généralement autour de 170 à 190 °C, en fonction de sa composition chimique spécifique [31].

I.12. Notion de chémotype :

Le chémotype (ou chémovar) désigne la variété chimique d'une plante aromatique appartenant à la même espèce botaniques, mais dont l'huile essentielle présente une composition majoritairement différente en principes actifs. Ce concept est crucial en aromathérapie car, bien que deux plantes aient le même nom latin, leurs effets thérapeutiques, leurs indications et leurs toxicités peuvent différer considérablement selon leur chémotype. La variation chimique dépend de facteurs environnementaux tels que le climat, le sol, l'altitude, la période de récolte et les conditions de distillation.

Le tableau au-dessus résume les principaux chémotypes *d'origanum floribundum* identifiés dans différentes régions d'Algérie. Il met en évidence la variabilité de la composition en huiles essentielles selon les localités, avec des composés dominants tels que le thymol, le carvacrol, le p-cymène et le γ -terpinène, reflétant une diversité chimique.

Tableau I.3 : Les principaux chémotypes d'*Origanum floribundum* identifiés dans différentes régions d'Algérie

Région de cette espèce	Chémotype	Composés dans cette espèce	Référence
<i>Origanum floribundum</i> de Chrèa	p-cymène 73,4 %	γ-terpinène 12,3 % thymol 6,1 % carvacrol 9,5 %	[32]
<i>Origanum floribundum</i> de Hammam Melouane	p-cymène 60,7 %	γ-terpinène 0,9 % thymol 2,5 % carvacrol 1,1%	[32]
<i>Origanum floribundum</i> de Lakhdaria (80 Km East of Algiers, altitude : 1100 m)	thymol 86.9%	p-cymène 5.1% linalool 1.3%	[33]
Kadiria commune algérienne située dans la wilaya de Bouira.	thymol 31,7 %	p-cymène 16 % γ-terpinène 21,2 %	[34]

I.13. Utilisation traditionnelle :

L'*origanum floribundum* Munby, est reconnue pour ses multiples applications dans les domaines médical, culinaire et industriel, principalement grâce à la richesse de son huile essentielle en composés bioactifs tels que le thymol, le carvacrol et le p-cymène.

I.13.1. Usages médicaux et thérapeutiques :

- **Antimicrobien et antifongique :** L'huile essentielle d'*o.floribundum* présente une activité antimicrobienne notable contre divers micro-organismes, notamment *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa* [35].
- **Antioxydant :** L'huile essentielle démontre une capacité antioxydante significative, comparable à celle de l'hydroxytoluène butylé (BHT) et du tocophérol (vitamine E), bien que légèrement inférieure à ces antioxydants de référence [32].
- **Insecticide naturel :** Des études ont révélé que l'huile essentielle d'*o.floribundum*, riche en thymol (jusqu'à 86,9 %), possède une activité larvicide efficace contre *Culex pipiens*, suggérant son potentiel en tant qu'alternative écologique pour le contrôle des vecteurs de maladies [36].

I.13.2. Usages culinaires :

- **Aromate traditionnel :** Les feuilles d'*o. floribundum* sont utilisées comme épice dans la cuisine locale, similaires à *l'origan commun*, pour aromatiser divers plats méditerranéens [32].

I.13.3. Utilisations industrielles et cosmétiques :

Les propriétés des huiles essentielles d'*o. floribundum* en font un ingrédient potentiel dans :

- **L'industrie agroalimentaire :** comme agent de conservation naturel grâce à ses activités antimicrobiennes.
- **Les produits cosmétiques :** pour ses effets purifiants et antiseptiques, notamment dans les savons et lotions.
- **Les produits de nettoyage :** utilisées pour ses propriétés désinfectantes et son arôme agréable.

Partie 2 : Etude antérieures de genre *origanum*

Les plantes de la famille des *Lamiacées*, ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques et biologiques par intérêt économique surtout pour leurs huiles essentielles.

I.1. Étude de la composition chimique d'huile essentielle d'*origan* :

Les huiles essentielles du genre *Origan* sont caractérisées par une grande diversité chimique influencée par des facteurs tels que l'espèce, les conditions environnementales, et le chémotype. Elles sont majoritairement composées de monoterpènes, sesquiterpènes, et de phénols qui confèrent leurs propriétés biologiques et thérapeutiques remarquables.

I.1.1. Monoterpènes :

Les monoterpènes sont formés à partir du couplage de deux unités d'isoprène (C₁₀). Ce sont les molécules les plus représentatives constituant 90% des HE et permettant une grande variété de structures. Ces composés peuvent être : monoterpènes acycliques, monocycliques, bicycliques. Ils se composent de plusieurs fonctions : alcools, aldéhydes, cétones, esters, peroxydes et phénols [37]. L'huile essentielle *d'origanum floribundum* contient des

monoterpènes, tels que le p-cymène, le γ -terpinène et le thymol. Ces composés sont des hydrocarbures cycliques volatils, caractéristiques des monoterpènes, et sont présents en quantités significatives dans l'huile essentielle de cette plante.

I.1.2. Sesquiterpènes :

L'huile essentielle *d'origanum floribundum* contient une faible proportion de sesquiterpènes. Une étude a révélé que les sesquiterpènes représentaient environ 0,1 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle de cette plante. Les sesquiterpènes sont des hydrocarbures terpéniques constitués de trois unités d'isoprène, soit 15 atomes de carbone. Bien qu'ils soient présents en faibles quantités dans l'huile essentielle *d'origanum floribundum*, ces composés peuvent contribuer à certaines propriétés organoleptiques et thérapeutiques de l'huile essentielle. Même si les sesquiterpènes sont présents en très faibles concentrations dans l'huile essentielle *d'origanum floribundum*, ils font partie de sa composition chimique globale [38].

I.1.3. Phénols :

L'huile essentielle *d'origanum floribundum* contient des phénols, notamment le thymol et le carvacrol. Ces composés phénoliques sont responsables de nombreuses propriétés biologiques de l'huile essentielle, telles que son activité antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire. Par exemple, une étude a révélé que le thymol représente environ 38,3 % de la composition chimique de l'huile essentielle *d'origanum floribundum*, tandis que le carvacrol est également présent à environ 1,8 %. Ces deux phénols sont des composants majeurs de l'huile essentielle et contribuent à ses effets thérapeutiques. De plus, une analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a montré la présence de groupes fonctionnels caractéristiques des phénols, tels que les bandes d'absorption autour de 3407cm^{-1} et 1290cm^{-1} , ce qui confirme la présence de composés phénoliques dans l'huile essentielle. *L'origanum floribundum* est une source riche en phénols, ce qui en fait un sujet d'intérêt pour des applications en aromathérapie, en cosmétique et en phytothérapie [39].

Tableau I.4 : Composition chimique majoritaires de l'huile essentielle d'espèces d'*origan*.

Les espèces	Composition	Utilisation	Référence
<i>Origanum vulgare</i>	-Carvacrol : 60–80 % -Thymol : 5–20 % - γ -Terpinène : 5–10 % -p-Cymène : 5–15 %	Espèce la plus connue, utilisée en cuisine sous le nom d' <i>origan</i> .	[40]
<i>Origanum floribundum</i> Munby :	-Carvacrol : 40–86,9% -p-Cymène : 5,1–53,4% -Linalool : 1,3–16,1% - γ -Terpinène : 12,2–28,7%	Utilisation comme alternative naturelle aux insecticides chimiques pour la lutte contre les moustiques et les tiques.	[41]
<i>Origanum majorana</i>	- γ -Terpinène : 17,35–19,2% -Linalool : 13,8–15,37% - β -Caryophyllène : 2,4% -Thymol : 1,32%	Utilisé comme herbe aromatique, les digestifs : soulagent les troubles intestinaux, les ballonnements et les spasmes.	[42] [43]
<i>Origanum onites</i>	-Carvacrol : 47,99% -Sabinene hydrate : 6,14% -Caryophyllène : 1,17%	Utilisé en cuisine, notamment en Grèce, en Sicile et en Turquie.	[16]
<i>Origanum syriacum</i>	- Thymol : 17,9% - p-Cymène : 8,7% - Terpinolène : 0,2%	Utilisé dans le mélange d'épices za'atar au Moyen-Orient.	[44]
<i>Origanum virens</i>	- Carvacrol : 68,1% - γ -Terpinène : 9,9% - p-Cymène : 4,5%	L'huile essentielle d' <i>origanum virens</i> est utilisée pour ses propriétés relaxantes et antiseptiques.	[40]

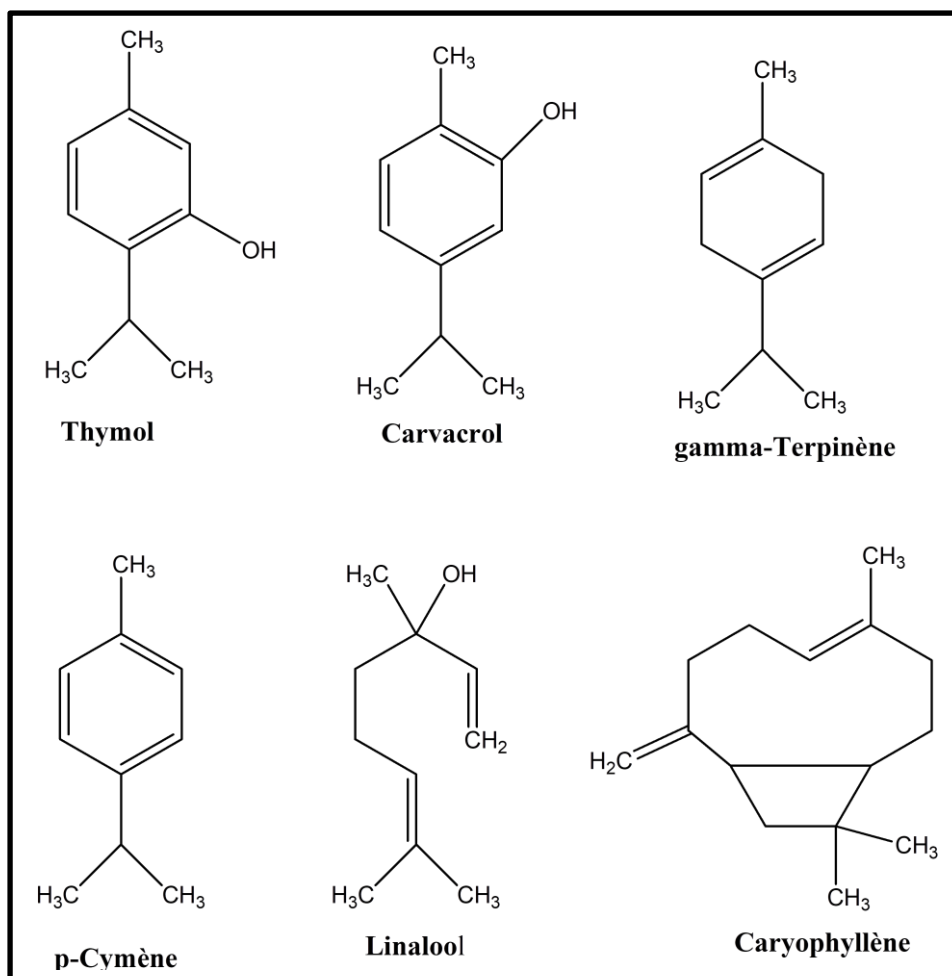


Figure I.2. : Structures de quelques composés chimiques d'espèce d'*origanum floribundum*.

I.2. Activités biologiques des espèces d'*origan* :

Les huiles essentielles du genre *origanum* possèdent une large gamme d'activités biologiques, principalement en raison de leur composition chimique riche en composés bioactifs. Voici les principales activités d'*origan* :

II.2.1. Activité Antioxydante :

Une étude publiée en 2019 a évalué l'activité antioxydante de cette huile essentielle en utilisant le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Les résultats ont montré que l'huile essentielle d'*Origanum floribundum* présente une capacité de piégeage du radical DPPH comparable à celle de l'hydroxytoluène butylé (BHT) et du tocophérol (vitamine E) aux concentrations de 600, 800 et 1000 mg/l. Cependant, à des concentrations de 100, 200 et 400

mg/l, son efficacité est inférieure à celle de ces antioxydants de référence, avec une valeur IC_{50} de $500,71 \pm 16,97$ mg/l [3].

Une autre étude a comparé l'activité antioxydante de l'huile essentielle *d'origanum floribundum* avec celle des extraits méthanoliques (ME) en utilisant les tests DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur du fer. Les résultats ont indiqué que les extraits méthanoliques étaient généralement plus efficaces que les huiles essentielles en raison de leur richesse en composés antioxydants tels que les polyphénols et les flavonoïdes. Cependant, l'huile essentielle d'*Origanum floribundum* a montré une activité antioxydante significative, notamment dans le test DPPH, avec une valeur IC_{50} de $369,9 \pm 3,1$ µg/ml, comparable à celle du BHT 230 µg/ml [36].

L'huile essentielle *d'origanum floribundum* présente des propriétés antioxydantes intéressantes, bien que généralement moins puissantes que celles des extraits méthanoliques riches en polyphénols. Néanmoins, elle demeure une source précieuse de composés antioxydants et pourrait être utilisée dans diverses applications, notamment dans les domaines de la cosmétique et de la santé naturelle.

I.2.2. Activité Antibactérienne :

L'activité antibactérienne de l'HE a été évaluée sur un total de 45 souches bactériennes, sur lesquelles une étude a été réalisée comprenant : la détermination des diamètres des zones d'inhibition et la détermination des CMI. Afin d'interpréter les résultats. Selon ce dernier, une souche bactérienne est considérée comme résistante (-) à un extrait végétal si son diamètre d'inhibition est égal à 6 mm ou inférieur à 8 mm, elle serait de sensibilité limitée (+) si son diamètre d'inhibition est compris entre 8 et 14 mm, de sensibilité moyenne (++) si son diamètre d'inhibition est compris entre 14 mm et 20 mm et enfin très sensible (+++) si son diamètre d'inhibition est supérieur à 20 mm[45]. Pour l'interprétation des valeurs des (CMI). Selon eux, un extrait posséderait une forte inhibition si sa CMI est inférieure à 0,5 mg/ml, elle serait modérée si elle est comprise entre 0,6 et 1,5 mg/ml et enfin faible si elle est supérieure à 1,6 mg/ml [46].

La méthode de microplaque est une technique de laboratoire utilisant des plaques à 96 puits pour réaliser des tests biochimiques ou microbiologiques en petites quantités, de manière rapide, standardisée et économique. Elle est largement utilisée pour évaluer l'activité

antibactérienne, par exemple via la méthode de microdilution, où l'on expose des bactéries à différentes concentrations d'un extrait ou d'un antibiotique afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) [47].

Conclusion :

La revue bibliographique approfondie menée autour du genre *origanum* met en lumière son intérêt scientifique, médicinal et économique. En particulier, l'espèce *origanum floribundum* Munby, c'est une plante aromatique traditionnellement utilisée dans les remèdes populaires pour traiter divers maux. L'HE montre une bonne activité antioxydante, mais reste moins efficace que les extraits méthanoliques, et l'évaluation de l'activité antimicrobienne se base sur deux critères : une souche est très sensible si le diamètre d'inhibition dépasse 20 mm, tandis que la classification d'Aligiannis Considère l'activité comme forte si la CMI est $< 0,5$ mg/ml. Malgré son potentiel élevé, cette plante reste encore peu étudiée scientifiquement, ce qui renforce la pertinence de travaux de recherche approfondis pour explorer et exploiter pleinement ses propriétés.

CHAPITRE II

Partie expérimentale

II.1. Introduction :

Cette étude porte sur *origanum floribundum*, une plante médicinale et aromatique largement répandue en Algérie, dans le but de valoriser son potentiel bioactif. Les objectifs principaux de ce travail consistent à extraire et quantifier les polyphénols et flavonoïdes, à déterminer les rendements d'extraction, et à réaliser l'extraction de l'huile essentielle (HE) par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de Clevenger. En complément, une macération pour la préparation d'extraits végétaux ainsi qu'un criblage phytochimique seront effectués pour identifier les composés présents. Par ailleurs, l'étude inclut l'analyse des propriétés physico-chimiques, l'évaluation du contenu total en phénols et flavonoïdes, ainsi que l'investigation de leurs activités biologiques, notamment antioxydante et antibactérienne.

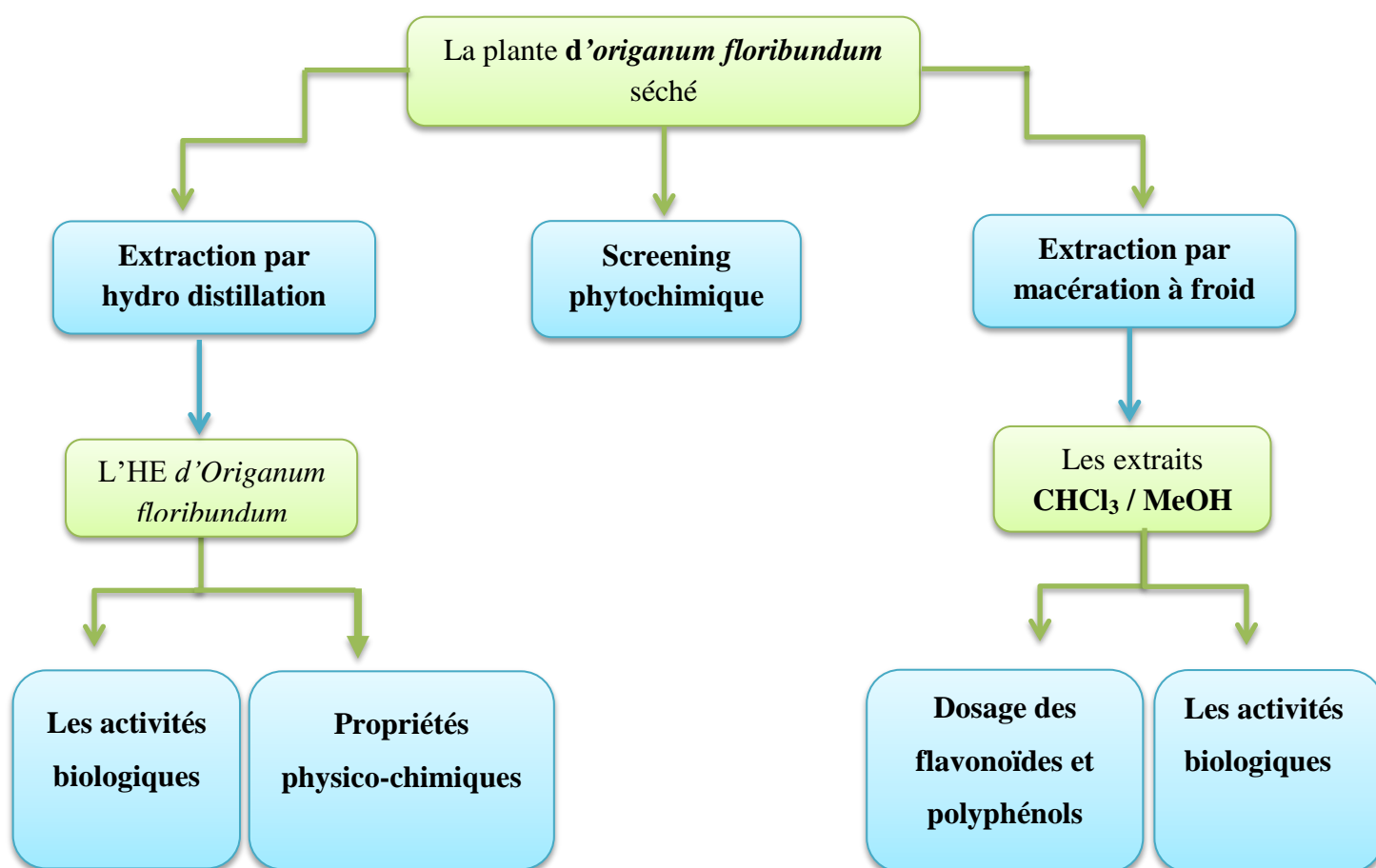


Figure II.1 : Diagramme général des procédures expérimentales.

II.2. Site de prélèvement :

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne, des feuilles et des fleurs et a été récolté fin mai et début juin 2024 dans la commune d'Amariya, l'une des communes de la province algérienne de Médéa, plus précisément dans la commune d'Ouled Ibrahim. Cette zone est connue pour sa richesse en flore méditerranéenne, et offre des conditions écologiques favorables à la croissance de cette espèce endémique. La cueillette a été réalisée de manière manuelle, en respectant les périodes optimales de floraison afin de préserver la qualité des principes actifs contenus dans la plante.

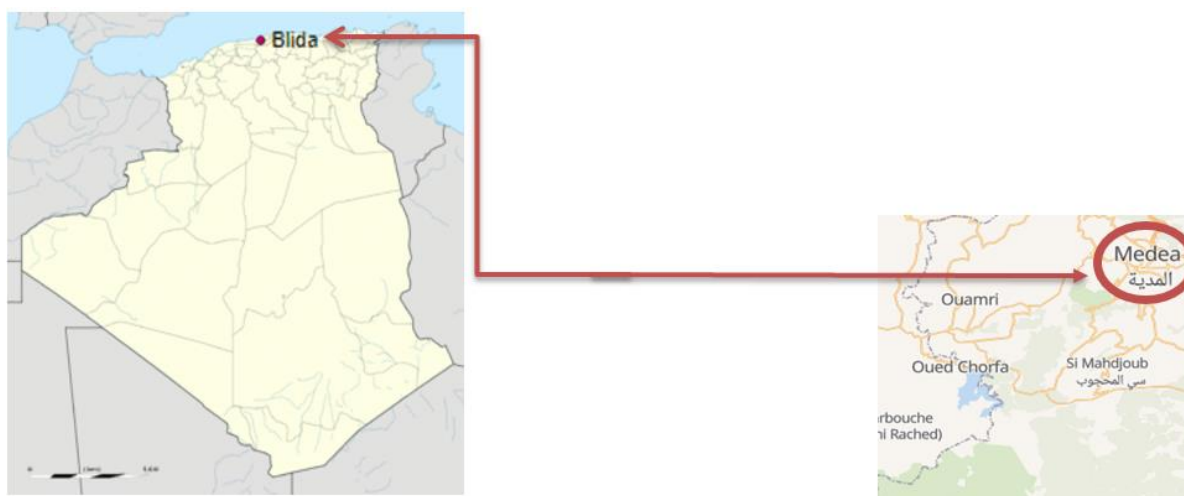


Figure II.2 : Carte géographique de l'emplacement de la plante étudiée.

II.3. Préparation de plante :

La plante *origanum floribundum* est préparée pour le séchage afin de préserver ses propriétés aromatiques et médicinales. La récolte se fait de préférence tôt le matin, après l'évaporation de la rosée, lorsque la concentration en huiles essentielles est optimale. On sélectionne les parties saines de la plante, notamment les feuilles et les fleurs, puis on les nettoie délicatement pour enlever la poussière, sans utiliser d'eau si possible. Ensuite, la plante est étalée en fines couches sur une surface propre, dans un endroit sec, bien aéré et à l'abri du soleil direct. Le séchage dure plusieurs jours, jusqu'à ce que les feuilles deviennent cassantes. Enfin, la plante sèche est conservée dans des contenants hermétiques, à l'abri de la lumière et de l'humidité, pour garantir une bonne conservation de ses qualités thérapeutiques et aromatiques.



Figure II.3 : La plante étudiée (fraîche et sèche)

II.4. Etude phytochimique :

II.4.1. Extraction des huiles essentielles (HE) :

II.4.1.1. Hydrodistillation (type Clevenger) :

- **Objectif :**

Extraire les huiles essentielles (HE) à partir d'un matériel végétal par la technique d'hydrodistillation, à l'aide d'un appareil de type Clevenger.

Mode opératoire :

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Les extractions ont été effectuées par ébullition de 492,41g, ont 6 sessions, chaque fois, on prend un poids correspondant au matériel végétal dans un ballon de deux litres. De l'eau distillée a été ajoutée jusqu'à recouvrir entièrement la matière végétale ou, alternativement, jusqu'aux 2/3 du volume du ballon, selon les besoins expérimentaux. Les vapeurs formées montent le long de la colonne en entraînant avec elles les HE. Ces vapeurs sont condensées dans un réfrigérant, et le condensât (eau + HE) est récupéré dans une ampoule à décanter. L'HE obtenue est séparée minutieusement de la phase aqueuse par une simple décantation, et on récupère l'HE à l'aide d'une pipette Pasteur pour éviter la perte de matière. La phase aqueuse est également récupérée et mélangée avec le distillat d'une autre extraction afin d'obtenir une plus grande quantité d'HE (Figure II.4). Les HE obtenues,

fluides, de couleur orange et dégageant une très forte odeur fraîche et agréable, sont conservées dans des flacons ombragés hermétiques à basse température (4 °C) et à l'abri de la lumière pour éviter toute dégradation, la perte de leur activité biologique et la toxicité.

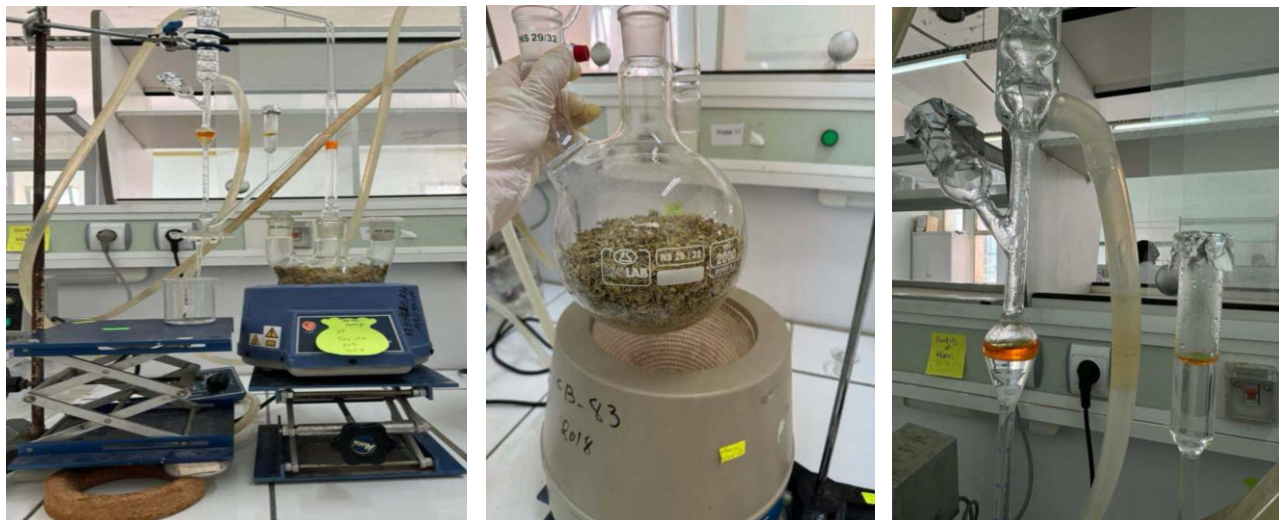


Figure II.4 : Hydrodistillation (Clevenger type).

II.4.2. Méthode d'extraction (Macération à froid) :

Une quantité de 200g de plante sèche est soigneusement pesée, puis placée dans un dessiccateur propre et sec. La matière végétale est ensuite immergée dans du chloroforme (CHCl_3), utilisé comme solvant organique, en quantité suffisante pour recouvrir entièrement l'échantillon. Le mélange est laissé en macération à température ambiante pendant 72 heures. À l'issue de la macération, le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre pour séparer le résidu végétal du filtrat organique. Après, une deuxième macération est effectuée avec la même plante mais par un autre solvant, qui est le méthanol, afin de prendre deux extraits. Le filtrat est ensuite évaporé à sec sous pression réduite à 35-40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif pour éliminer les solvants du filtrat. Ainsi, on obtient les extraits secs bruts notés : E. CHCl_3 , E.MeOH.

- Les solvants utilisés dans cette étude ont été choisis pour leur capacité à extraire efficacement les composés bioactifs tels que les polyphénols et les flavonoïdes. Le choix du solvant détermine la nature des composés extraits, en fonction de sa polarité donc :

- La phase CHCl_3 sépare les produits très apolaires tels que les acides gras, les stérols et les caroténoïdes.

- La phase de MeOH sépare les produits les plus polaires comprenant les oses et osides, les hétérosides, les acides aminés, les acides phénoliques et les tanins.

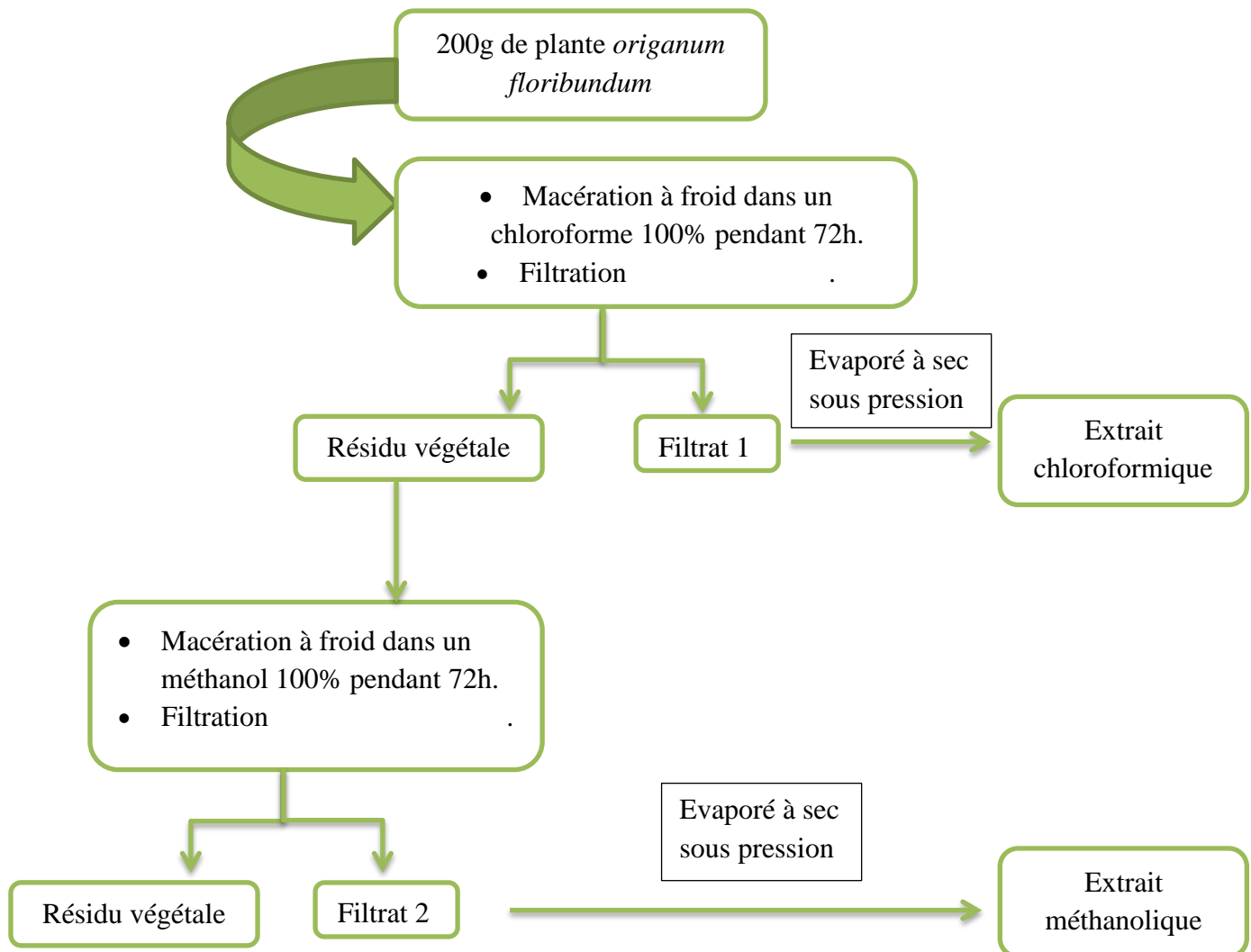


Figure II.5 : Méthode d'extraction (macération à froid).

II.4.3. Caractéristiques physico- chimiques de l'huile essentielle :

II.4.3.1 Caractéristiques physiques :

- **Le rendement :** Selon la norme AFNOR (1986), Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après l'évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction selon l'équation suivante décrite par Diana :

$$R \% = m (\text{ext}) / m (\text{éch}) \times 100\%$$

R : est le rendement en % ;

m ext : est la masse de l'extrait après évaporation en g ;

m éch : est la masse de la matière sèche végétale en g ;

- **La densité :** C'est la masse volumique de la substance par rapport à la masse volumique du corps de référence à 20°C. La mesure de la densité de l'échantillon se fait par pycnomètre (figure II.6), selon les étapes suivantes : Sur une balance de précision, on pèse :

- Le pycnomètre vide et sec, puis on tare son poids.
- Le pycnomètre rempli d'eau, jusqu'au trait de jauge.
- Le pycnomètre rempli d'huile, jusqu'au trait de jauge.
- On note les résultats et calcule la densité par la loi suivant : $\rho = \frac{m}{v}$

Donc $d = \frac{\rho}{1}$.

II.4.3.2. Caractéristiques chimiques :

- **Indice d'acide(Ia) :**

Principe : l'indice d'acide correspond à la quantité d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libres dans 1g d'HE.

Mode opératoire : l'indice d'acide est déterminé en ajoutant 0,1 g d'HE à 1ml d'éthanol et 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine comme indicateur coloré la solution ainsi obtenue est titrée par une solution de KOH, de normalité 0,1N jusqu'à l'apparition d'une coloration rose-pâle(AFNOR, 1982).

L'indice d'acide d'HE est calculé par la formule suivante : **IA=56, 1. v.c/m**



Figure II.6 : pycnomètre

IA: indice d'acide

v : volume de KOH en L.

c : concentration de KOH en mol/l

m : masse de l'échantillon (0.1 g).

56, 1 : constante.

- **Indice de saponification :**

Protocole expérimentale :

- On prend 0,25g de l'échantillon pour essai. Introduire la prise d'essai dans le ballon, puis, à l'aide d'une burette, ajouter 15ml de solution de KOH (0,5 mol/l).
- On place un réfrigérant ascendant et plonge l'ensemble dans un bain-marie. On chauffe jusqu'à ébullition pendant 30 min. On détermine la fin de la réaction de saponification lorsqu'on obtient une solution transparente et homogène (absence de trace d'huile).
- Laisser refroidir le ballon et retirer le réfrigérant.
- Ajouter 5 gouttes de solution de phénolphthaléine et titrer l'excès de KOH avec la solution d'acide chlorhydrique à 0,5 mol/l.
- Parallèlement, dans un autre ballon, qui servira de témoin, les mêmes étapes de test sont réalisées sans l'ajout de l'huile essentielle (AFNOR, 1982).

- Pour calculer l'indice de saponification on utilise la formule suivante :

$$I_s = 28,05(V_0 - V_1) / m$$

Dans laquelle :

V0 : volume en ml d'HCl pour le blanc ;

V1 : volume en ml d'HCl pour la détermination ;

m : masse de la prise d'essai ;

28,05 : constante

- **Indice d'ester :** Pour calculer l'indice d'ester on utilise la formule suivante : **Ie = Is – Ia**

II.4.4. Screening phytochimique :

Principe : Le screening repose sur l'utilisation de tests chimiques spécifiques qui réagissent avec certains groupes de métabolites secondaires pour produire des changements visibles (comme des précipitations, des colorations ou une mousse), permettant ainsi d'identifier leur présence dans l'extrait végétal.

1. Préparation des extraits :

- **L'extrait végétal hydro-alcoolique :** Dans un bécher on fait macérer, à température ambiante, pendant 24 heures, ont préparé 10 g du matériel végétal dans 100 ml de mélange méthanol-eau (70/30) utilisé pour l'extraction des composés bioactifs d'une plante en vue d'un screening phytochimique.

Filtrer le mélange à l'aide d'un papier Whatman et récupérer le filtrat.

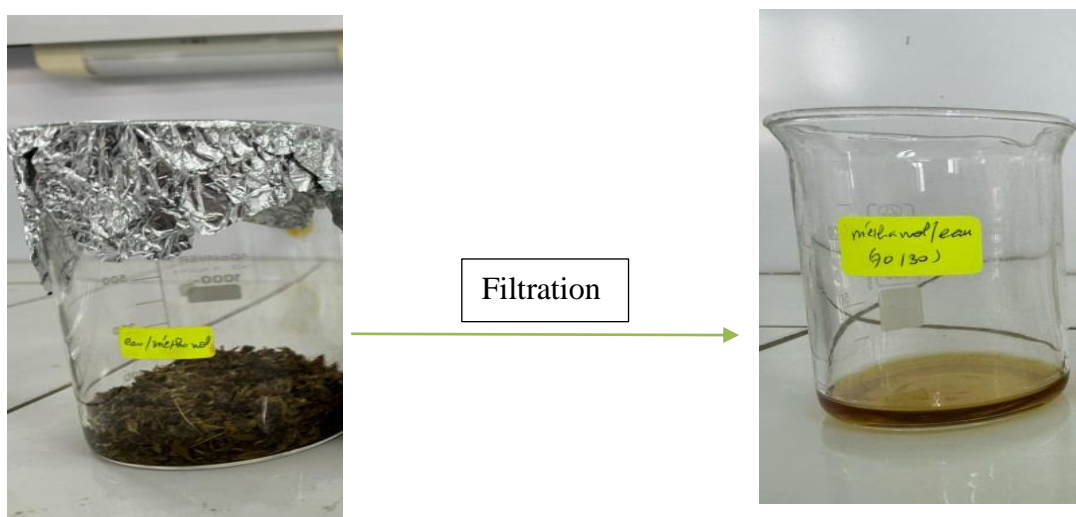


Figure II.7 : L'extraits préparés (Eau /MeOH).

- **L'extrait végétal de l'acide sulfurique :**

Préparé en introduisant 0,2 g de matériel végétal dans un erlenmeyer, suivi de l'ajout de 10 ml d'acide sulfurique dilué. Le mélange est ensuite agité vigoureusement pendant 2 minutes. Après agitation, la solution est filtrée pour obtenir un extrait acide clair.

2. Préparation de réactifs :

Le réactif de Mayer :

Il est obtenu en dissolvant 5 g d'iodure de potassium (KI) dans environ 50 ml d'eau distillée. Ensuite, on ajoute progressivement 1,36 g de chlorure de mercure (HgCl_2) à cette solution, tout en agitant jusqu'à dissolution complète. Le volume final est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée. Ce réactif doit être conservé dans un flacon opaque, à l'abri de la lumière.

Le réactif de Dragendorff : Préparé à partir de deux solutions de base.

- **Solution A** : est composée de 1,7 g de nitrate de bismuth dissous dans un mélange de 20 g d'acide tartrique et d'eau distillée, avec un volume final ajusté à 100 ml.
 - **Solution B** : contient 10 g d'iodure de potassium dissous dans 100 ml d'eau distillée.
- Les deux solutions sont ensuite mélangées à parts égales. À ce mélange, on ajoute 10 g supplémentaires d'acide tartrique, puis on complète le volume à 100 ml avec de l'eau distillée. Le réactif final est également stocké dans un récipient sombre pour éviter toute dégradation.

3. Tests de détection des composés bioactifs :

3.1. Flavonoïdes : Test de Wiltater (test des flavonols et flavanones)

On met dans trois tubes 2 ml d'extrait hydro-alcoolique, dont :

- Le 1er tube est un témoin.
- Dans le 2ème tube, on met 0,5 ml d 'HCl concentré.

On ajoute tout doucement quelques fragments de magnésium et on laisse agir sous la hotte. L'apparition d'une couleur qui vire vers le rouge pourpre (flavonols) ou le rouge violacé (Flavonones et flavonols) confirme l'existence des flavonoïdes.

1.2.Tannins :

On met dans 2 tubes 2 ml d'extrait hydro-alcoolique, dont :

- Le 1er tube est un témoin.
 - Le 2ème tube mélange 2 ml d'extrait avec 0,5 ml de chlorure ferrique à 0,1 % (FeCl_3 en solution méthanolique).
- La coloration bleu-noir indique la présence de tanins hydrolysables (galliques).
 - La coloration brun-verdâtre révèle la présence de tanins condensés (catéchiques) [48].

3.3. Saponosides :

On prend 0,5 g de plante séchée et on l'ajoute à 80 ml d'eau distillée, puis on chauffe à ébullition douce pendant 5 minutes. Après refroidissement et filtration, on prend 10 ml de l'extrait, que l'on place dans un tube à essai et agite pendant 30 secondes. L'extrait est ensuite laissé au repos pendant 10 à 15 minutes [49].

Une mousse persistante de plus de 1 cm de hauteur indique la présence de saponosides [50].

3.4. Terpènes et stérols (Test de Salkowski) :

Préparation de l'extrait organique :

Pour préparer l'extrait organique d'*origanum floribundum*, 5g de plante séchée sont introduits dans un bécher, puis on ajoute 50 ml de chloroforme. Le mélange est laissé en macération à température ambiante pendant 24 heures. Une fois la macération terminée, la solution est filtrée à l'aide d'un papier filtre, et l'extrait organique récupéré est conservé dans un flacon propre.

Réaction avec l'acide sulfurique :

On prélève 1 ml de l'extrait organique obtenu, que l'on dissout dans 2 ml de chloroforme dans un tube à essai. Ensuite, on ajoute délicatement 1 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré en inclinant le tube pour permettre la formation de deux phases distinctes. L'observation des résultats se fait visuellement : une coloration rouge à rouge-brun apparaissant dans la phase inférieure indique la présence de triterpènes, tandis qu'une coloration allant du jaune à l'orange est le signe de la présence de stéroïdes [51].

3.5. Sucres réducteurs :

• Préparation de l'extrait aqueux d'*origanum floribundum* séché :

Pour la préparation de l'extrait aqueux d'*origanum floribundum* séché, 5 g de plante sont introduits dans un bécher contenant 50 ml d'eau distillée. Le mélange est ensuite porté à ébullition douce pendant 10 à 15 minutes afin d'extraire les sucres et autres composés hydrosolubles. Après chauffage, la solution est laissée à refroidir à température ambiante, puis filtrée pour obtenir un extrait aqueux.

• Test de Fehling (détection des sucres réducteurs) :

La détection des sucres réducteurs peut être réalisée à l'aide du test de Fehling. Ce test utilise deux solutions : le réactif de Fehling A, constitué de sulfate de cuivre ($CuSO_4 \cdot 7H_2O$) à 7 %, et le réactif de Fehling B, composé d'une solution alcaline de tartrate de sodium et de potassium (sel de Rochelle). Pour effectuer le test, on mélange 1 ml de l'extrait aqueux filtré

avec 1 ml de Fehling A et 1 ml de Fehling B, puis on chauffe le mélange au bain-marie à 80°C pendant environ 5 minutes. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence de sucres réducteurs dans l'extrait [52].

3.6. Alcaloïdes :

On met dans 4 tubes 2 ml de l'extrait d'acide sulfurique, dont :

- Le 1er tube (témoin).
- Dans le 2ème tube, on ajoute 5 gouttes de réactif de Mayer.
- Dans le 3ème tube (témoin).
- Dans le 4ème tube, on ajoute 5 gouttes de réactif de Dragendorff.

La présence d'alcaloïdes est constatée par des réactions de précipitation avec les révélateurs généraux :

- Blanc jaunâtre dans le deuxième tube.
- Orange dans le quatrième tube [52].

II.5. Quantification des composés phénoliques :

C'est une méthode permet la détermination de la quantité de polyphénols et de flavonoïdes présents dans un extrait préparé à partir de notre plante *Origanum floribundum*.

II.5.1. Dosage des polyphénols totaux :

Principe :

Cette méthode repose sur une réaction d'oxydoréduction entre les composés phénoliques présents dans l'échantillon et le réactif de Folin-Ciocalteu, un mélange d'acides phosphomolybdique et phosphotungstique [53]. En milieu alcalin, les groupements hydroxyles des polyphénols réduisent ces acides, entraînant la formation d'un complexe bleu mesurable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 770nm [54]. L'intensité de la coloration bleue est proportionnelle à la concentration totale en composés phénoliques de l'échantillon. Les résultats sont généralement exprimés en équivalents d'acide gallique (mg GAE/g) d'échantillon, en utilisant une courbe d'étalonnage établie avec des solutions standards d'acide gallique [55].

Mode opératoire :

1. Préparation des solutions :

- **Solution standard d'acide gallique :**

On pèse 10 mg d'acide gallique que l'on dissout dans une fiole jaugée de 10 ml, on ajoute petite quantité d'eau distillée. On agite jusqu'à dissolution complète, puis on complète avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

- **Solution de Na_2CO_3 à 7,5 % :**

On prépare la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 % en dissolvant 7,5 g de Na_2CO_3 dans 100 ml d'eau distillée.

- **Solution de l'extrait CHCl_3 et extrait MeOH à 0.5 mg/ml :**

Pour préparer l'extrait en vas dissoudre 2 mg dans 4 ml de méthanol. La solution a été bien agitée jusqu'à dissolution complète de l'extrait.

2. Préparation de la gamme étalon (dilutions de l'acide gallique) :

Pour préparer cette gamme, on numérote onze tubes à essai (C_1 à C_{11}). On ajoute 0,5ml de méthanol dans chaque tube. Dans le tube C_1 , on ajoute 1 ml de la solution mère d'acide gallique, puis on prélève 0,5 ml de cette solution pour le transférer dans le tube C_2 contenant déjà 0,5ml de méthanol. On homogénéise bien, puis on répète ce processus jusqu'au tube C_{11} , qui contient que du méthanol, et servira de blanc. Cette méthode permet d'obtenir une série de dilutions décroissantes en acide gallique. Ensuite, on ajoute dans chaque tube 2,5 ml d'eau distillée, puis 3 ml de la solution de Na_2CO_3 à 7,5 %. Enfin, on ajoute 0,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu. Après avoir bien agité les tubes, on laisse les mélanges incuber à température ambiante pendant 30 minutes, à l'abri de la lumière.

Après incubation, on mesure l'absorbance de chaque tube à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, à une longueur d'onde de 770nm. L'intensité de la coloration bleue développée est proportionnelle à la concentration en composés phénoliques. Une courbe d'étalonnage est ensuite tracée à partir des absorbances obtenues pour les différentes concentrations standards d'acide gallique [56].

3. Préparation le dosage de deux extraits (CHCl₃ et MeOH) :

- Le protocole expérimental utilisé dans la figure (II.8) [32] :

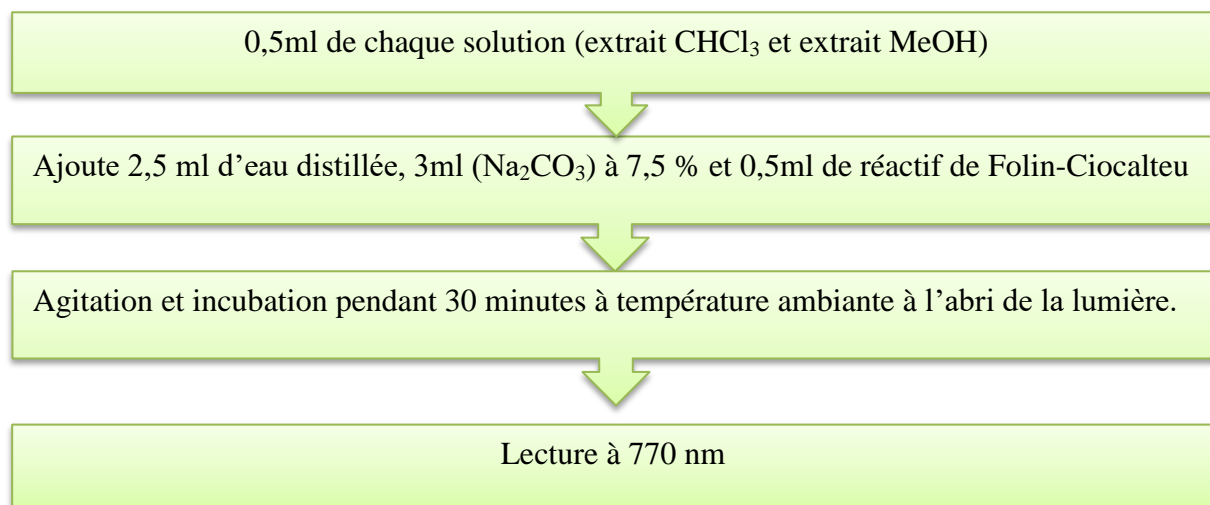


Figure II.8. Le protocole de dosage des polyphénols.

Après le calculer de la teneur par l'équation suivante : **Teneur (mg EAG/g)** = $\frac{C \times V}{m}$

C : concentration

V : volume (en L)

m : masse (en g)

II.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

Le dosage des flavonoïdes totaux est une méthode essentielle en phytochimie pour évaluer la teneur en flavonoïdes des extraits végétaux. Parmi les méthodes couramment utilisées, le test colorimétrique au chlorure d'aluminium (AlCl₃) est largement adopté en raison de sa simplicité et de sa fiabilité [57].

Principe :

Le chlorure d'aluminium réagit avec les groupes hydroxyles présents sur les flavonoïdes pour former des complexes stables, entraînant un changement de couleur mesurable par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en flavonoïdes dans l'échantillon.

1. Préparation des solutions :

- **Solution d' AlCl_3 à 2 %** : on prépare la solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2 % en dissolvant 2 g d' AlCl_3 dans 100 ml d'eau distillée. On agite bien pour une dissolution complète.
- **Solution de quercétine à 0,54 mg/ml** : on pèse 10,9 mg de quercétine que l'on dissout dans une fiole jaugée de 20 ml en ajoutant une petite quantité de méthanol. On agite jusqu'à dissolution complète, puis on complète avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

2. Préparation de la gamme étalon (dilutions de quercétine) :

Pour préparer cette gamme, on numérote onze tubes à essai (C1 à C7). On ajoute 2 ml de méthanol dans chaque tube. Dans le tube C1, on ajoute 4 ml de la solution mère de quercitrine, puis on prélève 2 ml de cette solution pour le transférer dans le tube C2 contenant déjà 2 ml de méthanol. On homogénéise bien, puis on répète ce processus jusqu'au tube C7, qui contient seulement du méthanol. Ensuite, on ajoute 2 ml de la solution d' AlCl_3 à 2 %. Après avoir bien agité les tubes, on laisse les mélanges incuber à température ambiante pendant 10 minutes. Après incubation, on mesure l'absorbance de chaque tube à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, à une longueur d'onde de 440 nm. Une courbe d'étalonnage est ensuite tracée à partir des absorbances obtenues pour les différentes concentrations standards de quercétine [56].

3. Préparation le dosage de deux extraits (CHCl_3 et MeOH) :

- Le protocole expérimental utilisé dans la figure (II.9) [32] :

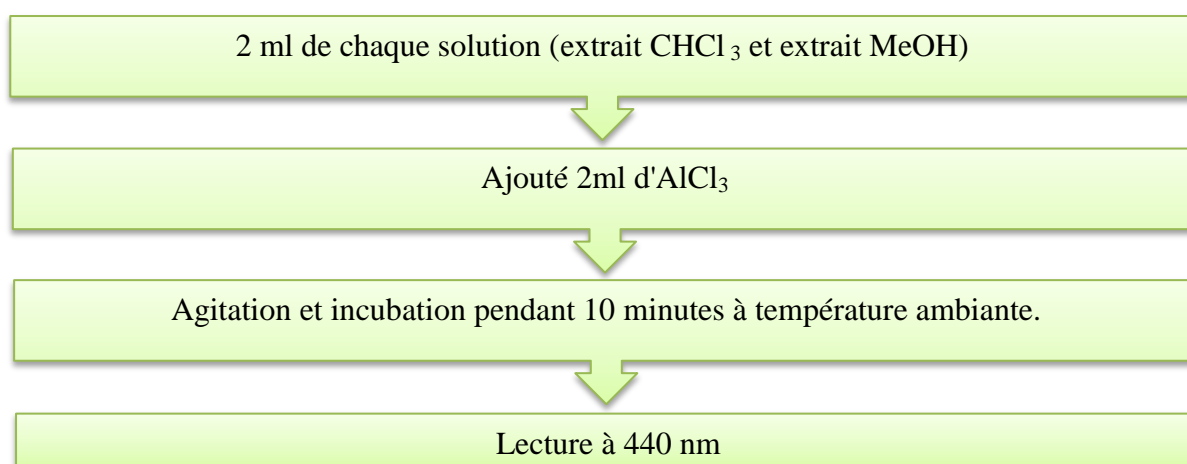


Figure II.9 : Le protocole de dosage des flavonoïdes.

Après calculer le teneur par équation suivante : **Teneur (mg EQ /g)** = $\frac{C \times V}{m}$

II.6. Les activités biologiques :

II.6.1. Évaluation de l'activité antioxydante :

Le test de DPPH° permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques en général) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle. La réduction du DPPH° est facilement mesurée par spectrophotométrie à 517 nm (λ_{max} DPPH°). La réaction sera plus ou moins rapide selon la nature de l'antioxydant, et la quantité de DPPH-H formée dépendra de la concentration en antioxydant.

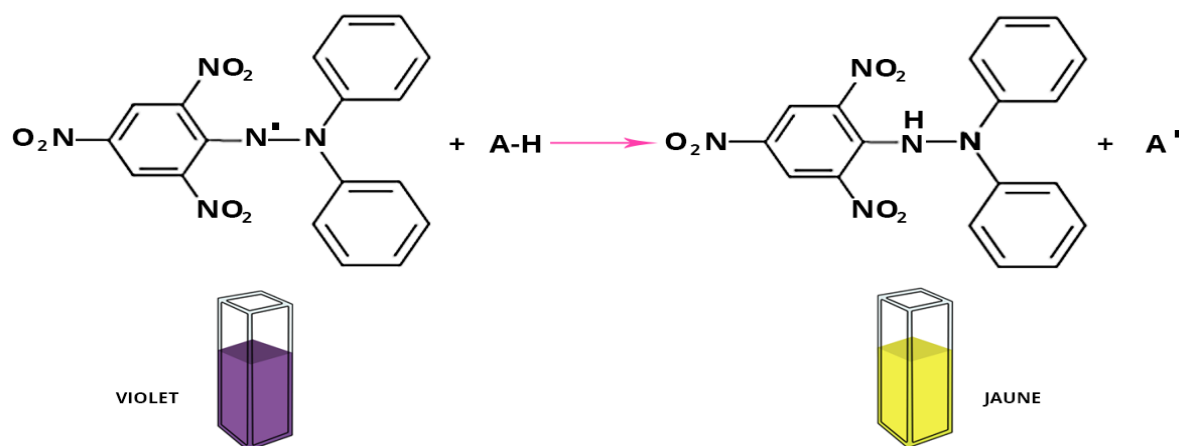


Figure II.10 : La réduction du DPPH.

Mode opératoire :

1. Préparation des solutions :

- solution de DPPH : dans une fiole de 100 ml, on prend 4mg de DPPH dilué dans 100 ml de méthanol sous agitation à température ambiante et incubation pendant 30 min puis conservé à l'abri de la lumière (recouverte de papier aluminium) afin d'éviter toute dégradation par la lumière.
- Solution d'HE à 0,5 mg/ml : l'huile essentielle a été préparée à une concentration de 0,5mg/ml dans méthanol.

- Solution de l'extrait CHCl_3 à 2 mg/ml : L'extrait chloroformique a été également préparé à une concentration mère de 2 mg/ml dans le méthanol.

Cet extrait présentait une couleur verte marquée par la présence de chlorophylle. Cette coloration peut interférer avec la lecture des absorbances dans le test DPPH, car elle fausse les résultats spectrophotométriques. Pour éliminer cette coloration, une étape de décoloration a été réalisée à l'aide du charbon actif.

Décoloration de l'extrait chloroformique par charbon actif :

Pour enlever la couleur verte de l'extrait, on a utilisé un petit montage composé d'un ballon de 5 ml, d'un entonnoir, de deux seringues et d'un peu de charbon actif. D'abord, on a mis un petit disque de coton au fond d'une seringue. Puis, on a ajouté une petite quantité de charbon actif par-dessus. On a ensuite versé la solution d'extrait dans cette seringue. Pour faire passer la solution à travers le charbon, on a utilisé une deuxième seringue vide en appuyant doucement pour créer une pression. Cela a permis de retenir la chlorophylle tout en gardant les composés utiles. La solution filtrée, plus claire, a été récupérée dans le ballon et utilisée directement pour le test DPPH.

2. Préparation des échantillons dans la microplaque :

- Pour le premier test, une solution mère d'acide ascorbique à 1mg/ml a été préparée. A partir de cette solution, une série de dix dilutions a été réalisée. La dilution a été effectuée en transférant 80 μl de la solution mère dans un second puits contenant 80 μl de méthanol (dilution 1/2), ont été transférés dans les puits 1 à 10 d'une microplaque. Puis en répétant l'opération en série. Chaque dilution a été soigneusement homogénéisée. Le puits 11 a servi de témoin blanc, contenant seulement 80 μl de méthanol sans acide ascorbique.
- Pour les tests de l'huile essentielle et de l'extrait chloroformique d'*origanum floribudum*, des solutions à 0,5mg /ml et 2mg/ml ont également été préparées. Pour chaque échantillon, 80 μl de solution ont été ajoutés dans 10 puits de la microplaque, et le 11^{ème} puits à été utilisés comme blanc contenant uniquement 80 μl de méthanol.

Après, un volume de 320 μl la solution de DPPH a ensuite été ajoutés dans chaque puits contenant un échantillon ou un blanc. Après l'ajout, le contenu de chaque puits a été mélangé délicatement en tapotant légèrement la microplaque, en prenant soin d'éviter la formation de bulles.

3. Incubation :

Une fois tous les puits remplis et mélangés, la microplaque a été recouverte de papier aluminium pour empêcher la lumière d'altérer la réaction. La plaque a ensuite été laissée à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. Cette étape permet au radical DPPH de réagir avec les antioxydants présents dans les échantillons.

4. Lecture des résultats :

Après incubation, le papier aluminium a été retiré, puis la microplaque a été placée dans un lecteur de microplaque. L'absorbance de chaque puits a été mesurée à une longueur d'onde de 517 nm. Les valeurs obtenues ont été notées avec précision pour chaque puits. Ces données permettront ensuite de calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par chaque concentration testée, et d'évaluer l'activité antioxydante des échantillons.

II.6.2. Évaluation de l'activité antibactérienne :

Le mode opératoire :

Pour la préparation du milieu de culture, 12 g de poudre LB (Luria-Bertani) sont dissous dans 500 ml d'eau distillée en agitant jusqu'à dissolution complète. Le pH est ensuite ajusté à 7 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1M), puis le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C.

Pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'HE et deux extraits (E.CHCl₃ et E.MeOH) de plante *Origanum floribundum*. On utilise la méthode de microdilution en bouillon selon les recommandations du comité européen EUCAST a été évaluée en présence de différentes souches bactériennes pour caractériser leur efficacité antibactérienne. L'HE et les deux extraits ont été préparés à une concentration de 10 mg/ml dans du diméthyl sulfoxyde DMSO stérile. Ensuite nous avons rempli le premier puit de chaque ligne de la microplaque 96 puit avec 300 µl de bouillon LB. Les 11 puits suivants ont été remplis avec 150 µL de bouillon LB. 30 µl ont été retirés du premier puits, et remplacés par 30 µl de la solution testée (HE, E.CHCl₃ et E.MeOH). Une série de dilutions successives au rapport (1/2) a été réalisée manuellement de puit en puit jusqu'au dixième, permettant d'obtenir une gamme de concentrations décroissantes. Le onzième puit a été utilisé comme contrôle négatif, contenant uniquement du milieu LB (Luria-Bertani). Le douzième puit a

servi de contrôle positif, contenant uniquement le milieu LB et la suspension bactérienne. Ensuite, nous avons ajouté 20 µl de la suspension bactérienne dans chaque puits, sauf dans le puit 11. La plaque a été incubée à 37 °C pendant 24 heures dans des conditions stériles. Ce protocole a été appliqué à chacune des souches bactériennes testées.

- Souches bactériennes :

Tableau II.1 : Les souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Souches bactériennes	Caractéristiques
- <i>Escherichia coli</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif
- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterococcus faecalis</i>	Gram positif

Comparaison entre souches Gram+ et Gram- : Les bactéries Gram+ se montrent globalement plus sensibles aux traitements, ce qui corrobore les données de la littérature. Les Gram- disposent d'une membrane externe lipopolysaccharidique qui agit comme une barrière supplémentaire limitant la pénétration des substances antimicrobiennes.

CHAPITRE III :

Resultat et discission

III. Étude phytochimique :

III.1. Détermination du rendement d'extraction :

III.1.1. Le rendement d'HE d'*Origanum floribundum* :

Du processus d'hydrodistillation (Clevenger type) nous avons obtenu les résultats suivants :

Tableau III.1 : Rendement d'extraction d'HE.

La matière végétale en (g)		Poids HE en (g)	Le rendement %	Echantillon		Aspect	Couleurs
M	52,41	1,748	3,335	R	HE de		
totale	40	1,852	4,63	totale	Plante		Orange
492,41	100	3,83	3,83	4,119	<i>origanum</i>	Huileuse	Après
	100	4,054	4,054		<i>Floribundum</i>		Jaune pale
	100	4,8621	4,8621				
	100	3,9407	3,9407				

L'huile essentielle obtenue, généralement fluide, de couleur orange après jaune pâle et dotée d'une odeur fraîche et intense, est soigneusement récupérée, après stockée dans des flacons en verre ambré hermétiques. Ces flacons sont conservés à basse température, à l'abri de la lumière, afin de préserver la stabilité et l'activité biologique des composés extraits.

Les études basées sur la littérature, utilisant la même méthode, ont obtenu un rendement de 4,06 % [9]. Ainsi, le rendement obtenu dans notre étude représente une bonne valeur.

III.1.2. Le rendement d'extrait d'*Origanum floribundum* :

Dans cette étude, le rendement d'extrait sec, obtenu après évaporation par rapport à 200 g de la matière végétale. Le rendement des deux extraits (CHCl₃, MeOH), l'aspect et le solvant de macération de différents modes d'extraction ont été présentés dans le Tableau (III.3) suivant :

Tableau III.2 : Rendement d'extrait des extraits.

Matière végétale (g)	Extraits	Aspects	Couleurs	Masses (g)	Les rendements %
200	CHCl ₃	Solide	Vert foncé	63,73	31,865
	MeOH	Visqueuse	Vert foncé	20,62	10,31

Par la méthode d'extraction par macération à froid, le rendement le plus élevé a été obtenu par E.CHCl₃, avec une moyenne de 31,865% suivie par l'E.MeOH avec une moyenne de 10,31%.

III.2. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle :

III.2.1. Caractéristiques physiques :

III.2.1.1. Densité :

- Masse du pycnomètre vide et sec : $m = 24,62$ g
- Masse du pycnomètre rempli d'eau jusqu'au trait de jauge : $m = 34,72$ g
- Masse du pycnomètre rempli d'huile jusqu'au trait de jauge : $m = 33,22$ g
- Masse d'eau contenue dans le pycnomètre : $m_{\text{eau}} - m_{\text{vide}} = 10,10$ g
- Masse d'huile contenue dans le pycnomètre : $m_{\text{huile}} - m_{\text{vide}} = 8,60$ g

La densité mesurée de l'huile est de 0,851, une valeur en accord avec les propriétés physiques attendues. La méthode du pycnomètre s'avère fiable pour ce type de mesure.

III.2.2. Caractéristiques chimiques :

III.2.2.1. Indice d'acide (IA) :

$C=0,1$ N, $V=26$ mL= $0,026$ L, et $m=0,1$ g

L'indice d'acide (IA) d'une huile essentielle (HE) est un paramètre clé permettant d'évaluer la quantité d'acides libres présents dans l'échantillon. Dans ce cas, la valeur obtenue est de **1,456 mg KOH/g**, ce qui est considéré comme faible. Cette faible acidité est un indicateur favorable de qualité, suggérant que l'huile essentielle est peu oxydée, donc probablement

fraîche, et qu'elle a été correctement conservée, à l'abri de l'humidité, de l'air et de la lumière. Par ailleurs, cette valeur est conforme aux exigences des normes **AFNOR/ISO**, qui recommandent généralement des indices d'acide **inférieurs à 2** pour les huiles essentielles de haute qualité. En conclusion, l'huile essentielle analysée présente une bonne qualité chimique, caractérisée par une faible teneur en acides libres et une conservation adéquate. Elle est donc jugée apte à un usage thérapeutique ou cosmétique, selon son origine et son profil biochimique.

III.2.2.2. Indice de saponification :

- Masse de l'échantillon (m) = 0,25 g
- Volume de HCl pour le blanc (V_0) = 26,5 mL
- Volume de HCl pour la détermination (V_1) = 26 mL

L'indice de saponification (I_s) représente la quantité de potasse (KOH) nécessaire pour saponifier les esters (substances grasses) présents dans un gramme de matière grasse. Dans ce cas la valeur obtenue est de **56,1 mg KOH/g**, ce qui est relativement bas, ce qui est tout à fait normal pour une huile essentielle. Cette faible valeur est un bon indicateur de qualité, car elle reflète une faible teneur en substances grasses insaponifiables, ce qui est caractéristique des huiles essentielles pures, non mélangées avec des huiles végétales ou des additifs lipidiques.

L'huile essentielle de la plante *origanum floribundum* analysée, avec un indice de saponification de 56,1 mg KOH/g, montre donc un excellent niveau de pureté et une très faible présence de lipides complexes. Ce résultat est pertinent et acceptable dans le cadre de l'évaluation de la conformité de l'huile essentielle pour un usage thérapeutique, cosmétique ou industriel. Une valeur significativement plus élevée aurait pu indiquer une altération ou l'ajout de matières grasses étrangères.

III.2.2.3. Indice d'ester :

L'indice d'ester (Ie) représente la quantité de KOH (en mg) nécessaire pour saponifier les esters présents dans 1 g de matière grasse, après soustraction des acides libres déjà présents (mesurés par l'indice d'acide). L'huile essentielle *d'origanum floribundum* analysée présente un indice d'ester de 54,644 mg KOH/g, ce qui indique la présence mesurable d'esters, en complément de ses phénols majeurs. Cette valeur, combinée à un indice d'acide faible, confirme la pureté, la fraîcheur et la qualité de l'échantillon. Elle est donc tout à fait adaptée à un usage thérapeutique, cosmétique ou aromatique, conformément aux exigences des normes de qualité.

III.3. Screening phytochimique :

Le screening phytochimique constitue une étape préliminaire essentielle dans l'étude des extraits de plantes médicinales. Il permet d'identifier qualitativement les principaux groupes de métabolites secondaires présents, tels que les alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, saponines, terpènes, stéroïdes, etc. Ces composés bioactifs sont souvent responsables des propriétés pharmacologiques observées. Les résultats du screening phytochimique sont regroupés dans la Figure (III.1) et le Tableau (III.3) suivants :

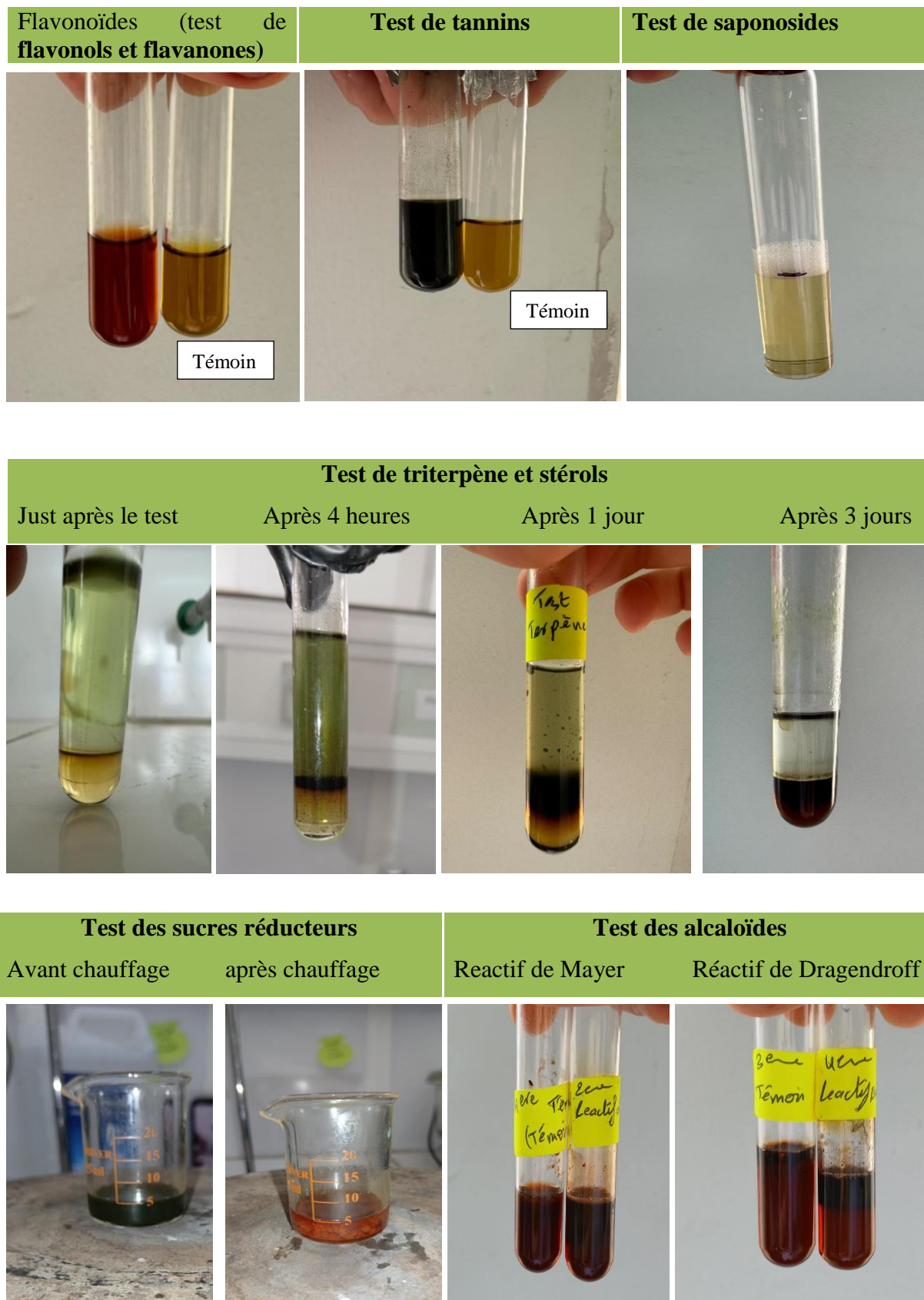


Figure III.1 : Résultat de screening phytochimique de plante *Origanum floribundum*.

Tableau III.3 : Résultats de screening phytochimique de plante *origanum floribudum*.

Composé	Coloration	Présence Absence	Interprétation
Flavonoïdes (flavonols et flavanones)	Il y'a un changement de couleur vers le rouge pourpre.	Indique la présence de flavonols dans l'extrait d' <i>Origanum floribundum</i>	Les flavonols identifiés, tels que la quercétine ou le kaempférol , sont des composés phénoliques bien connus pour leurs propriétés antioxydantes puissantes [58].
Tannins	Il y'a un changement de couleur vers bleu- noir.	indique la présence de tanins hydrolysables dans l'extrait d' <i>Origanum floribundum</i> .	Cette couleur résulte de la formation d'un complexe entre les sels de fer (FeCl ₃) et les groupements phénoliques, constituant principal des tanins hydrolysables. Ces composés sont connus pour leurs propriétés antioxydantes [59].
Saponosides	Pas de changement de couleur.	Présence l'apparition d'une mousse	Les saponosides sont des glycosides naturels possédant des propriétés tensioactives.
Terpènes et stérols	-Phase supérieur toujours vert pale le 3eme jour est devenu plus claire -Phase inférieur jaune-orange après apparition d'une couche rouge-brun entre les phases après la couleur rouge-brun en bas.	Présence de stérols au début après chaque jour la présence de triterpènes.	- Just après le test : la présence de stérols mais il a une zone noire entre deux phase. Soit il a une oxydation progressive ou début de formation de triterpènes colorés en faible quantité. - Après 4 h : la coloration devient plus marquée avec une zone brun-noir visible à la base. La phase inférieure montre aussi une teinte orangée. Cette évolution traduit une réaction chimique continue, révélant une possible présence de triterpènes en concentration faible, qui réagissent lentement. Après 1 jour : la réaction et continue pas stabilisée et la zone prendre un couleur rouge-

			<p>brun et continue de baisser.</p> <p>Après 3 jours : la phase inférieure est clairement rouge-brun foncé, alors que la phase supérieure est devenue plus claire. Cette teinte est caractéristique des triterpènes. Sa présence tardive confirme que la réaction nécessite du temps pour que les triterpènes réagissent pleinement ou deviennent visibles.</p>
Sucres réducteurs	Rouge brique	Présence	L'apparition d'un précipité rouge brique.
Alcaloïdes	Pas de changement de couleur	Absence	l'extrait <i>d'origanum floribundum</i> ne contient pas des alcaloïdes.

III.4. Quantification des composés phénoliques :

III.4.1. Dosage des polyphénols totaux :

Tableau III.4 : Résultats des absorbances obtenues pour les différentes concentrations standards d'acide gallique.

Concentration (mg/ml)	0	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078
Absorbance (nm)	0,035	3,672	1,882	0,985	0,458	0,201	0,102	0,075	0,044

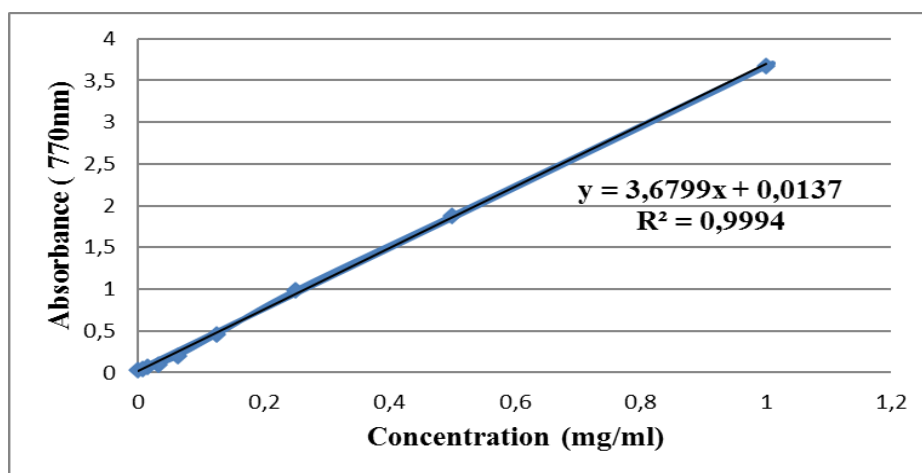


Figure III.2 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique des polyphénols totaux.

La courbe d'étalonnage d'acide gallique des polyphénols totaux. Donner une excellente linéarité avec une valeur de $R^2=0,9994$, ce qui indique que la méthode analytique utilisée est fiable et reproductible. La relation entre la concentration (x) des composés phénoliques et l'absorbance (y) à 770 nm est donnée par l'équation suivante : $y = 3,6799 x + 0,0137$

Cette équation permet de calculer la concentration des composés phénoliques présents dans les extraits d'*Origanum floribundum* à partir de l'absorbance mesurée.

- **Extrait CHCl_3** : absorbance = 2.048 nm **C = 0.5528 mg/ml**
- **Extrait MeOH** : absorbance = 0.268 nm **C = 0.0691 mg/ml**

Le dosage des composés phénoliques totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu a permis d'évaluer la richesse en polyphénols des différents extraits d'*Origanum floribundum*. Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique (mg EAG/g d'extrait).

- **Extrait CHCl_3** : Teneur (mg EAG/g) = $\frac{0,5528 \times 0.5}{0.002} = 138,2 \text{ mg EAG/g}$
- **Extrait MeOH** : Teneur (mg EAG/g) = $\frac{0,0691 \times 0.5}{0.002} = 17,275 \text{ mg EAG/g}$

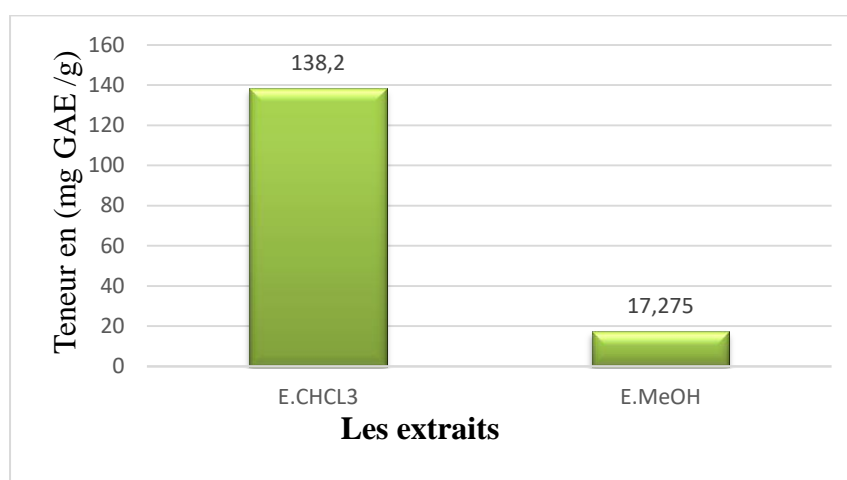


Figure III.3 : Les histogrammes de la quantité en (mg EAG /g) des polyphénols dans les deux extraits.

Ces valeurs montrent une variabilité importante de la teneur en polyphénols selon la nature de l'extrait. L'extrait chloroformique présente la plus forte teneur en polyphénols, suivi de l'extrait méthanolique. Ces différences peuvent s'expliquer par la polarité des solvants utilisés. Le chloroforme, un solvant moyennement polaire, semble extraire efficacement certains composés phénoliques spécifiques à cette polarité. Le méthanol, plus polaire, extrait

d'autres types de polyphénols, mais en quantité moindre ici, ce qui peut dépendre de la nature chimique des composés présents dans la plante.

Ces résultats indiquent qu'*origanum floribundum* est une source intéressante de composés phénoliques, en particulier dans son extrait chloroformique. On peut utiliser cette plante pour ses propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, qui sont généralement dues aux polyphénols.

Dans une autre étude, des parties aériennes d'*o.floribundum* ont été collectées la région de Blida (Chr  a et à Hammam Melouane). L'extrait de chr  a était plus élevé que celle de l'extrait de Hammam Melouane (92,3 contre 66,4 mg d'équivalent acide gallique (EAG) par gramme d'extrait, respectivement) [32].

Cette différence peut s'expliquer en fonction des conditions environnementales du site de collecte et en fonction du stade de développement, en tenant compte du fait que l'étude des échantillons a été collectée au début du cycle végétatif, tandis que notre étude était récoltée au début de la floraison.

III.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

Tableau III.5 : Résultats des absorbances obtenues pour les différentes concentrations standards de quercétine.

Concentration (mg/ml)	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039	0.0019	0.00097	0
Absorbance (nm)	2.251	1.204	0.632	0.307	0.159	0.087	0.04	0.041

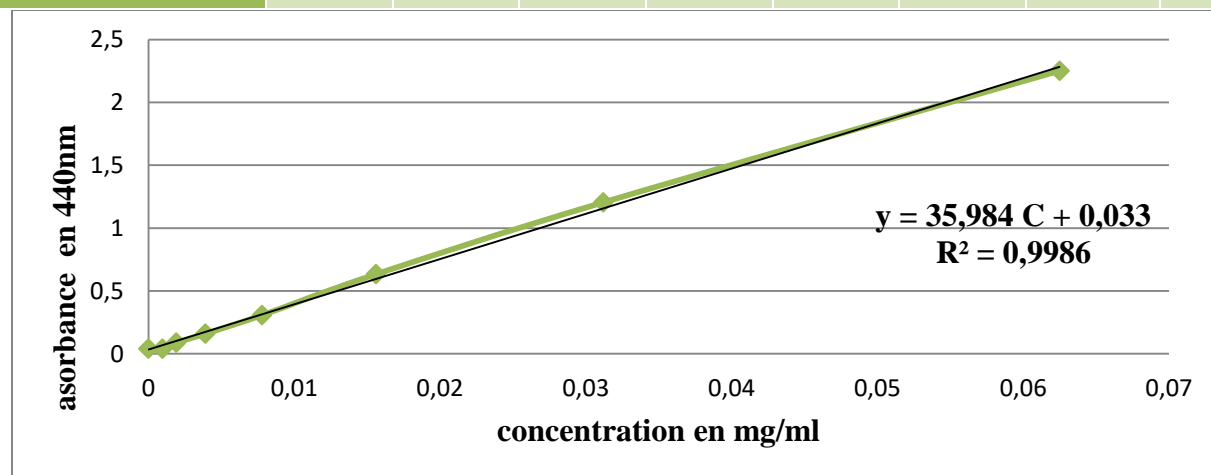


Figure III.4 : Courbe d'étalonnage la quercétine.

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé en mesurant l'absorbance des extraits à 440 nm. Une courbe d'étalonnage a été obtenue à partir de différentes concentrations d'un standard, vraisemblablement la quercétine, avec une excellente corrélation linéaire ($R^2 = 0,9986$). L'équation de la droite d'étalonnage est : $y = 35,984 C + 0,033$

Les concentrations des extraits ont été déterminées par réarrangement de cette équation, à partir de leurs absorbances respectives :

- **Extrait CHCl_3** : absorbance = 0.643 nm **C = 0.0169 mg/ml**
- **Extrait MeOH** : absorbance = 0.308 nm **C = 0.00764 mg/ml**

La teneur en flavonoïdes totaux, exprimée en mg d'équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g) Où V est le volume de l'extrait utilisé (2ml) et m la masse de l'échantillon (en g). Les résultats sont :

- **Extrait CHCl_3** : Teneur (mg EQ/g) = $\frac{0.0169 \times 2}{0.002} = 16.9 \text{ mg EQ/g}$
- **Extrait MeOH** : Teneur (mg EQ/g) = $\frac{0.00764 \times 2}{0.002} = 7.64 \text{ mg EQ/g}$

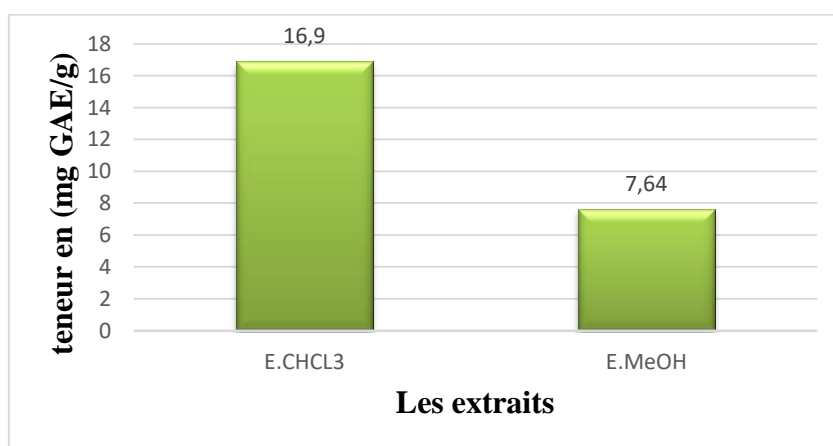


Figure III.5 : Les histogrammes de la quantité en (mg EQ /g) des flavonoïdes dans les deux extraits.

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques largement présents dans les plantes, connus pour leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes. Leur quantification est essentielle pour évaluer le potentiel biologique des extraits végétaux. Les résultats obtenus pour *origanum floribundum* montrent une variation significative de la teneur en flavonoïdes totaux selon le type d'extrait. L'extrait chloroformique présente la concentration la plus élevée (16,9 mg EQ/g), suivi par l'extrait méthanolique (7,64 mg EQ/g). Ces différences s'expliquent par la

polarité des solvants utilisés et la nature des flavonoïdes présents dans *o.floribundum*. Bien que le méthanol soit un solvant polaire efficace pour l'extraction des flavonoïdes, il est probable que cette espèce contienne une proportion importante de flavonoïdes peu polaires (comme certains aglycones ou méthylés), mieux solubilisés dans le chloroforme. Ce dernier, bien que moins polaire, semble avoir une meilleure affinité pour ces composés spécifiques.

Et dans autre étude des parties aériennes d'*o.floribundum* ont été collectées la région de Blida (Chr  a et à Hammam Melouane). L'extrait de chr  a était plus élevé que celle de l'extrait de Hammam Melouane (55.3 vs. 41.2 mg EQ/ g) [32].

Conclusion générale sur les dosages des composés phénoliques et flavonoïdiques :

Les résultats des dosages des polyphénols totaux (par la méthode de Folin-Ciocalteu) et des flavonoïdes totaux (par la méthode colorimétrique à 440 nm) montrent que la richesse en composés bioactifs varie fortement selon le solvant d'extraction utilisé.

- **L'extrait chloroformique (CHCl₃)** se distingue nettement, affichant les teneurs les plus élevées aussi bien en polyphénols totaux (138,2 mg EAG/g) qu'en flavonoïdes totaux (16,9 mg EQ/g). Cela suggère que ce solvant moyennement polaire est particulièrement efficace pour extraire des composés phénoliques peu polaires, notamment certains flavonoïdes spécifiques à *origanum floribundum*.
- **L'extrait méthanolique (MeOH)** : bien que polaire et classiquement utilisé pour l'extraction des composés phénoliques hydrophiles, présente des teneurs modérées en polyphénols (17,275 mgEAG /g) et en flavonoïdes (7,64 mg EQ/g). Cela pourrait indiquer que la plante contient une proportion importante de composés peu polaires, moins solubles dans un solvant fortement polaire comme le méthanol.

La meilleure efficacité du chloroforme par rapport au méthanol dans l'extraction des composés phénoliques d'*origanum floribundum* s'explique par la différence de polarité des solvants et la nature des composés présents dans la plante. Le méthanol, très polaire, extrait principalement des composés hydrophiles, tandis que le chloroforme, moyennement polaire, est plus adapté aux composés phénoliques peu polaires comme les flavonoïdes aglycones ou méthylés. De plus, *o. floribundum* semble contenir une forte proportion de ces composés peu polaires, ce qui rend leur extraction plus efficace avec le chloroforme. Enfin, ce solvant pénètre bien dans les tissus végétaux riches en lipides, facilitant l'extraction à partir de structures comme les glandes sécrétoires.

III.5. Les activités biologiques :

III.5.1. Activité antioxydante :

Évaluation du pouvoir antiradicalaire par le DPPH l'extrait (CHCl_3) et l'HE d'*origanum floribundum*. Les activités antiradicalaires de l'extrait, HE et de l'acide ascorbique (vitamine C) ont été déterminées par la méthode au DPPH. On remarque un changement de couleur du violet au jaune pour l'extrait et HE en augmentant leur concentration, ce qui signifie que le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est réduit en présence d'une substance réductrice qui existe dans les extraits.

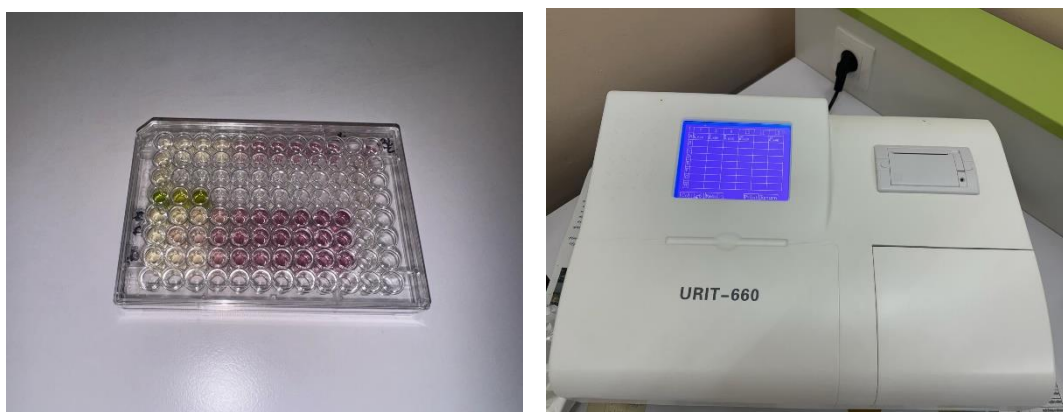


Figure III.6 : Le lecteur ELISA et microplaque utilisés pour l'activité antioxydante.

Afin d'évaluer le pouvoir antioxydant des différents échantillons, une analyse a été réalisée par la méthode du DPPH, reposant sur la capacité des composés à piéger les radicaux libres. Trois types d'échantillons ont été testés : l'extrait (CHCl_3) d'*Origanum floribundum*, l'huile essentielle (HE) de la même plante, ainsi que l'acide ascorbique (vitamine C) utilisé comme référence. Les mesures d'absorbance ont été effectuées à 517 nm à l'aide d'un lecteur ELISA, et le pourcentage d'inhibition (PI%) a été calculé pour chaque concentration.

Les résultats obtenus, à une longueur d'onde de 517 nm, ont permis de tracer les graphes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour l'extrait et l'HE d'*origanum floribundum*.

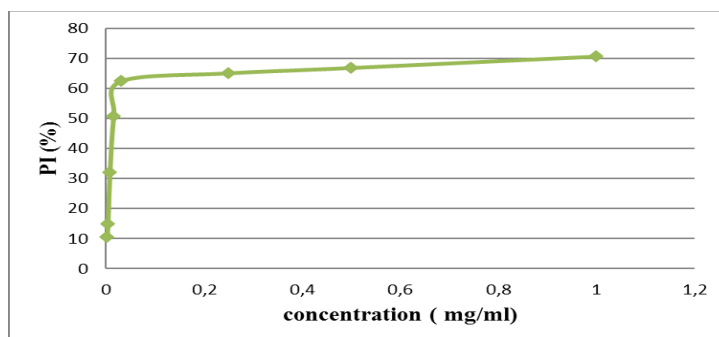


Figure III.7 : Courbe du pourcentage d'inhibition du DPPH par l'acide ascorbique.

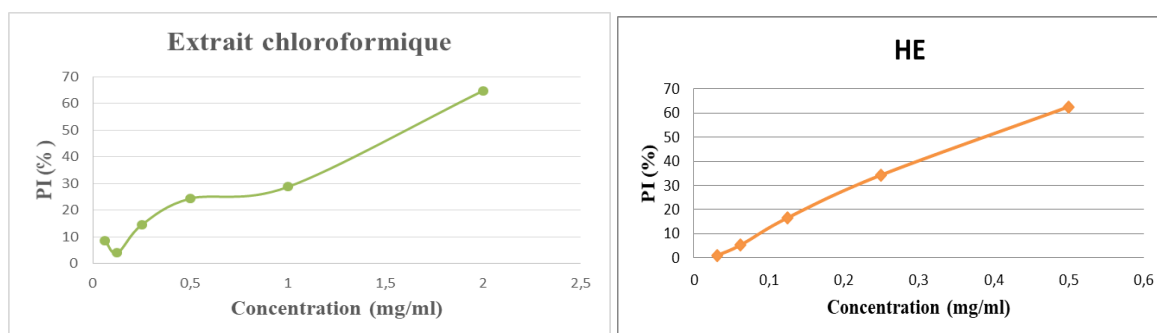


Figure III.8 : Courbe du pourcentage d'inhibition Du DPPH par l'extrait chloroformique et par l'HE.

Ces résultats ont également permis de déterminer la valeur de l'IC₅₀ (la valeur correspondant à 50 % d'inhibition) afin d'évaluer l'activité d'extrait et de l'HE vis-à-vis du standard, tableau (III.6).

Tableau (III.6) : les valeurs correspondant à 50 % d'inhibition d'extrait chloroformique et de l'HE et du standard.

Les extraits	Vitamine C	HE	E.CHCL ₃
IC ₅₀ (mg/ml)	0,0147	0,392	1,46

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*origanum floribundum* a été réalisée en déterminant la valeur de l'IC₅₀ (la concentration inhibitrice à 50 %), qui reflète la capacité d'un composé à neutraliser 50 % des radicaux libres. Plus cette valeur est faible, plus l'activité antioxydante est élevée. Dans cette étude, la vitamine C (acide ascorbique), utilisée comme référence antioxydante standard, présente une IC₅₀ de 0,0147 mg/ml, indiquant une forte capacité antioxydante. Comparativement, les extraits de la plante montrent les valeurs des IC₅₀ plus élevées :

- Huile essentielle (HE) : 0,392 mg/ml
- Extrait chloroformique (E.CHCL₃) : 1,46 mg/ml

Ces résultats suggèrent que les extraits d'*origanum floribundum* possèdent une activité antioxydante très faible, inférieure à celle de la vitamine C.

Ces résultats sont comparables un article qui ont étudié deux populations d'*origanum floribundum* provenant de deux régions distinctes d'Algérie : Hammam Melouane (OFHM) et Chréa (OFC). Dans leur étude, l'huile essentielle de la population OFC a montré une activité antioxydante acceptable (IC₅₀ ≈ 0,369 mg/ml) que celle de OFHM (IC₅₀ ≈ 1,0917 mg/ml), tandis que l'extrait méthanolique de OFC et OFHM a présenté une IC₅₀ 0,0379 mg/ml et 0,0559 mg/ml donc il ya une forte activité antioxydante dans extrait que HE [32].

La comparaison : l'activité antioxydante de l'huile essentielle obtenue dans notre étude (IC₅₀=0,392 mg/ml) est similaire à celle de OFC (0,369 mg/ml), ce qui suggère une efficacité modérée et comparable. Par contre, notre extrait chloroformique (IC₅₀ = 1,46 mg/ml) présente une activité beaucoup plus faible que les extraits méthanoliques des deux populations étudiées.

III.5.2. Activité antibactérienne :

Après une incubation de 24 heures à 37°C, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour l'huile essentielle ainsi que pour les extraits organiques d'*origanum floribundum* contre quatre souches bactériennes. La figure le tableau et ci-dessous présentent les résultats obtenus :



Figure III.9 : Résultats dans la microplaque de l'activité antibactérienne.

Tableau III.7 : Résultats de l'activité antibactérienne.

Micro-organisme cible	Type	ATCC (Référence)	CMI (mg /mL)		
			HE	E.CHCL ₃	E.MeOH
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie Gram+	25923	0,039	0,1562	0,3125
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bactérie Gram+	29212	0,039	2,5	1,25
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie Gram–	25922	> 10	2,5	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactérie Gram–	27853	2,5	5	10

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle (HE) et les extraits organiques (E.CHCl₃ et E.MeOH) d'*origanum floribundum* présentent une activité antibactérienne variable selon la souche bactérienne testée. L'analyse repose sur la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable d'inhiber visiblement la croissance bactérienne.

- ✚ **Efficacité de l'huile essentielle (HE) :** L'huile essentielle s'est révélée particulièrement efficace contre les bactéries Gram positives. En effet, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* présentent une CMI très faible (0,039 mg/mL), indiquant une forte sensibilité à l'HE. En revanche, aucune activité n'a été observée contre *Escherichia coli* (CMI > 10), tandis que la CMI contre *Pseudomonas aeruginosa* atteint 2,5 mg/ml, traduisant une efficacité plus modérée. Cette différence peut s'expliquer par la structure de la paroi des bactéries Gram-, plus résistante aux agents lipophiles.
- ✚ **Efficacité de l'extrait chloroforme (E.CHCl₃) :** Cet extrait montre une bonne activité contre *Staphylococcus aureus* (CMI = 0,1562), mais une efficacité nettement moindre sur les autres souches, avec des CMI de 2,5 pour *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli*, et de 5 pour *Pseudomonas aeruginosa*. Cela suggère une sélectivité relative de cet extrait pour certaines bactéries Gram+.
- ✚ **Efficacité de l'extrait méthanolique (E.MeOH) :** L'extrait méthanolique est globalement moins actif, avec des CMI allant de 0,3125 pour *S. aureus* à 10 pour les bactéries Gram-. Il est à noter que l'extrait méthanolique présente une activité assez remarquable pour les bactéries Gram +, que pour les bactéries Gram-. La différence d'efficacité entre les extraits peut être attribuée à la nature des composés extraits par chaque solvant : les composés polaires extraits par le méthanol semblent moins actifs que ceux extraits par le chloroforme ou contenus dans l'huile essentielle.

Conclusion générale et prescriptives :

Ce mémoire de fin d'études est consacré à l'étude phytochimique et biologique d'une espèce de la famille des *Lamiaceae* l '*Origanum floribundum* Munby, une espèce endémique de la flore algérienne appartenant au genre *origan*. L'objectif principal du travail est d'explorer la composition phytochimique de cette plante, en particulier celle de son huile essentielle et des extraits, et d'évaluer ses propriétés biologiques, notamment ses activités antioxydantes et antibactérienne.

L'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger a donné des résultats : le rendement total est de l'ordre de 4,11 %, ce qui représente un bon rendement, et la couleur de l'huile essentielle est orange, passant ensuite au jaune pâle. Parallèlement, des extraits organiques ont été préparés par macération séquentielle avec des solvants de polarité croissante (CHCl_3 , MeOH) afin de mieux cibler la diversité des métabolites secondaires. Le rendement le plus élevé a été obtenu par E. CHCl_3 , avec une moyenne de 31,865 %, suivi par l'E.MeOH avec une moyenne de 10,31 %. Après avoir mesuré la densité de l'HE à 0,851, celle-ci est conforme aux propriétés physiques attendues, et l'indice d'acide mesuré de 1,456 mg KOH/g indique une faible teneur en acides libres, ce qui reflète une bonne qualité de l'huile essentielle. Cette valeur suggère que l'échantillon est peu oxydé, bien conservé et conforme aux normes AFNOR/ISO, qui exigent généralement un indice inférieur à 2 pour garantir une huile essentielle de qualité. L'indice de saponification de 56,1 mg KOH/g obtenu pour l'huile essentielle *d'rganum floribundum* révèle une grande pureté et une faible teneur en lipides complexes. L'indice d'ester de 54,644 mg KOH/g de l'huile essentielle *d'rganum floribundum* indique la présence mesurable d'esters, en complément de ses phénols majeurs. Cette valeur, combinée à un indice d'acide faible, confirme la pureté, la fraîcheur et la qualité de l'échantillon.

Le screening phytochimique réalisé sur l'extrait *d'rganum floribundum* a révélé la présence de plusieurs groupes de métabolites secondaires, notamment des flavonoïdes, des tanins, des terpènes, des stérols, des saponosides et des sucres réducteurs, avec une absence d'alcaloïdes.

Dans la quantification des composés phénoliques le dosage des composés phénoliques totaux de la plante *origanum floribundum*, réalisé selon la méthode de Folin-Ciocalteu, a permis d'estimer la concentration en polyphénols dans différents extraits. Les résultats, exprimés en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g), révèlent une variation significative selon le solvant utilisé. L'extrait chloroformique (CHCl_3) présente la teneur la plus élevée, avec 138,2 mg EAG/g, traduisant une forte concentration en composés

phénoliques. En revanche, l'extrait méthanolique (MeOH) affiche une teneur bien plus faible, avec 17,275 mg EAG/g, indiquant une extraction moins efficace des polyphénols avec ce solvant. Ces résultats confirment l'influence du choix du solvant sur l'efficacité de l'extraction des composés bioactifs. Et les résultats obtenus pour la quantification des flavonoïdes totaux dans les extraits *d'origanum floribundum* mettent en évidence une variation significative entre les solvants d'extraction utilisés. L'extrait chloroformique (CHCl₃) présente une teneur plus élevée en flavonoïdes, estimée à 16,9 mg EQ/g d'équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g), contre 7,64 mg EQ/g pour l'extrait méthanolique (MeOH). Cette différence reflète une meilleure solubilité des flavonoïdes présents dans la plante dans le chloroforme, probablement en raison de leur nature moins polaire.

Pour l'activité antioxydante, l'extrait et l'HE ont été évalués par la méthode du test de réduction du radical libre DPPH. Les résultats ont montré que la capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans l'HE, donnant une valeur de 0,392 mg/ml, et dans l'extrait chloroformique (E.CHCl₃) avec 1,46 mg/ml. Ces résultats suggèrent que l'extrait *d'origanum floribundum* possède une activité antioxydante modérée.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne *d'origanum floribundum* montrent une efficacité variable en fonction du type d'extrait et de la souche bactérienne examinée. L'huile essentielle a révélé une activité significative contre les bactéries Gram positives, en particulier *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* (CMI = 0,039 mg/mL), tandis que son efficacité face aux bactéries Gram négatives, telles que *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 2,5 mg/mL) et *Escherichia coli* > 10, demeure limitée. L'extrait chloroformique (E.CHCl₃) montre une activité notable contre *S. aureus* (CMI = 0,1562 mg/mL), mais une efficacité inférieure sur les autres souches, indiquant une sélectivité pour les Gram positifs. En revanche, l'extrait méthanolique (E.MeOH) se révèle le moins efficace, avec des CMI plus élevées, surtout contre les Gram négatifs. Ces différences d'efficacité dépendent de la composition chimique des substances extraites par chaque solvant.

Ces résultats valident l'intérêt tant pharmacologique qu'industriel *d'o.floribundum*, surtout dans les secteurs de la phytothérapie, de la cosmétique bio et de la préservation agroalimentaire. Nous souhaitons poursuivre l'analyse de cette espèce en isolant et identifiant ses composés actifs, en mesurant leur toxicité et en examinant d'autres usages biologiques ou thérapeutiques possibles.

Références Bibliographique :

1. Bernard CHEMOUNY, Bernard POITEVIN, Encyclopædia Universalis / « MÉDECINES ALTERNATIVES », 8 décembre (2017).
2. Thomas Efferth, Paul C.H. Li, Venkata S. Badireenath Konkimalla et Bernd Kaina, « From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy », Trends in Molecular Medicine, vol. 13, no 8, août (2007), P 353–361.
3. Boulaghmen, F., Chaouia, C., & Fusi, D. (2017). Composition chimique et propriétés antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum* Munby. *Phytothérapie*, 15(4), P 249–258.
4. Sousa, D. P. de, Damasceno, R. O. S., Amorati, R., Elshabrawy, H. A., de Castro, R. D., Bezerra, D. P., Nunes, V. R. V., Gomes, R. C., & Lima, T. C. (2023). Essential oils : Chemistry and pharmacological activities. *Biomolecules*, 13(7), P 1144.
5. Dobignard, D., & Chatelain, C. (2012). Catalogue des plantes vasculaires de la Nouvelle-Calédonie. Liste des plantes et des données de distribution. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
6. Kabouche, Z., & Kabouche, A. (2005). Étude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. <https://www.ums.edu.dz> (Accès direct selon l'URL de l'université).
7. Ghorab, M., & Kassem, M. A. (2014). Chemical composition and biological activities of essential oils from Lamiaceae species: A review. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(3), P 381-395.
8. Ietswaart, J. H. (1980). A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae) (No. 4). Leiden University Press.
9. Mir, S., Bouchenak, O., Aït Kaci, K., Rouane, A., Alliliche, M., & Arab, K. (2022). Chemical composition and insecticidal activity of *Origanum floribundum* Munby essential oil endemic plant from Algeria. *Tropical Biomedicine*, 39(2), P 244–253.
10. DUBOIS, J. MITTRAND, H. & DAUZAT, A. (2006). Dictionnaire étymologique et historique du français, Ed. Larousse, P 1442.
11. Adam, Géraldine., Wittner, Laurence. et Mandigon, Catherine., « Les épices de la santé », Edition Ambre, Dijon-Quetigny, (Août 2003), P318.
12. Lukas, B., Schmiderer, C., & Novak, J. (2015). Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 119, P 32–40.

13. Bouyahya, A., Chamkhi, I., Benali, T., Guaouguaou, F.-E., Balahbib, A., El Omari, N., Taha, D., Belmehdi, O., Zengin, G., & El Menyiy, N. (2021). Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, P 113318.
14. Krigas, N., Lazari, D., Maloupa, E., & Stikoudi, M. (2015). Introducing Dittany of Crete (*Origanum dictamnus* L.) to gastronomy: A new culinary concept for a traditionally used medicinal plant. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2,P 112–118.
15. Mesmar, J., Abdallah, R., Badran, A., Maresca, M., & Baydoun, E. (2022). *Origanum syriacum* phytochemistry and pharmacological properties: A comprehensive review. *Molecules*, 27(13), P 4272.
16. Tatar, Ö., Sönmez, Ç., & Atasoy, G. D. (2012). *Photosynthetic and biochemical properties of selected oregano (Origanum onites) clones*. ResearchGate.
17. Guide illustré de la flore Algérienne,(2009), Wilaya d'Alger-mairie de paris, avec le soutien du ministère des affaires étrangères et européennes de la république française, P67.
18. QUEZEL, P. & SANTA, S. (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS (Ed.), Paris. Tome 2.
19. Quezel P. et Santa S., (1962-1963), Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris. C.N.R.S, vol. 2, P 1170.
20. Daoudi-Merbah, F., Hazzit, M., & Dahmani-Megrerouche, M. (n.d.). Influence of morphological variability and habitat on the chemical composition of essential oils of an Algerian endemic *Origanum* species (*Origanum floribundum* Munby), vol. 13 no. 8 (17 août 2016) Laboratory of Vegetal Ecology and Environment, Faculty of Biology, University of Algeria.
21. Steflitsch, W., & Steflitsch, M. (2008). Essential Oils in Medicine Today: Therapeutic Applications and Interactions. *International Journal of Clinical Aromatherapy*.
22. Willem, J.P, « Aroma_famille », Edition Albin Michel, Paris,(2005),P 219.
23. Bruneton, J., « Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales », Edition Tec & Doc, Paris, (1999), P 585.
24. Paris, M. et Hurabielle, M., « Abrégé de matière médicale pharmacognosie », Tome 1 Généralités monographies, Edition Masson, Paris, (1980), P 339.
25. Anton, R. et Strasbourg, A.L., « Plantes aromatiques : épices aromates, condiments et huiles essentielles », Edition Tec & Doc, Paris (2004), P 522.

26. Jullien, A., Aromathérapie : se soigner par les huiles essentielles, Paris : Marabout, (2017).
27. Pierron C., Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs, (2014).
28. Baser, K. H. C., Kurkcuoglu, M., Houmani, Z., & Abed, L. (2011). Composition of the essential oil of *Origanum floribundum* Munby from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 12(6), P 753–756.
29. Moncada, J., Tamayo, J. A., & Cardona, C. A. (2016). Techno-economic and environmental assessment of essential oil extraction from oregano (*Origanum vulgare*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in Colombia. *Journal of Cleaner Production*, P112(Part 1), P172–181.
30. de Sousa, D. P., Damasceno, R. O. S., Amorati, R., Elshabrawy, H. A., de Castro, R. D., Bezerra, D. P., Nunes, V. R. V., Gomes, R. C., & Lima, T. C. (2023). Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. *Biomolecules*, 13(7), P1144.
31. ChemicalBook, 8007-11-2 (Origanum oil) Product Description, ChemicalBook, s.d. (consulté le 23 juin 2025),
32. Hadjadj, N., & Hazzit, M. (2020). Analysis and antioxidant activity of essential oils and methanol extracts of *Origanum floribundum* Munby. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(1), P 85–96.
33. Mir, S., Bouchenak, O., Aït Kaci, K., Rouane, A., Alliliche, M., & Arab, K. (2022). Chemical composition and insecticidal activity of *Origanum floribundum* Munby essential oil endemic plant from Algeria. *Tropical Biomedicine*, 39(2), P 215–220.
34. Zahi, M.E.H., Mouhouche, F. & Hazzit, M. (2021). Insecticidal activity of three essential oils combined to mineral substances against *Tribolium confusum* Duval 1868 (Coleoptera, Tenebrionidae). *Revue Agrobiologia* 11: P 2336-2345.
35. Brada, M., Saadi, A., Wathelet, J. P., & Lognay, G. (2013). The essential oils of *Origanum majorana* L. and *Origanum floribundum* Munby in Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(3), P 497–502.
36. Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.) (2015). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* (second Ed.). CRC Press.
37. Toumi, M., Aouinet, A., Medjdoub, H., & Zellagui, A. (2019). Étude phytochimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum*. *Phytothérapie*, vol. 17, n° 5. P 249-256.

38. Boukhatem, M. N., Saidi, F., & Laksiri, M. (2017). Phytochemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Origanum floribundum*. Natural Product Research.
39. Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Gonçalves, M. J., Proença da Cunha, A., Pio, C. F., & Pedro, L. G. (2003). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* from Portugal. Journal of Essential Oil Research, 15(5), P 334–339.
40. Baser, K. H. C., Kurkcuoglu, M., Houmani, Z., & Abed, L. (2000). Composition of the essential oil of *Origanum floribundum* Munby from Algeria. Journal of Essential Oil Research, 12(6), P 753–756.
41. Dantas, T. R. S., Estrela, F. N., Lima, D. J. B., da Costa, R. A., da Cunha, F. A. B., Alves, C. N., & Trindade, R. A. (2016). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oil from *Origanum majorana* L. cultivated in Brazil. *Pharmacognosy Magazine*, 12(46), P 236–240.
42. Khadhri, A., Mokni, M., & Mkadmini, K. (2019). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of *Origanum majorana* essential oil cultivated in Tunisia. *Biologia*, 74(11), P 1431–1438.
43. Farhat, M., Tóth, J., Héthelyi, B. É. Szarka, Sz. & Czigle, Sz. (2012). Analysis of the essential oil compound of *Origanum syriacum* L. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, 59,P 6–12.
44. Mahfouf, N. (2018). *Étude de l'espèce Origanum vulgare L.* [Mémoire de Master, Université Chadli Benjedid - El Tarf]. HAL Archives Ouvertes.
45. Duraffourd C., D'Hervicourt L. et Lapraz J. C., (1990). Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.
46. N. Aligiannis , Eleftherios Kalpoutzakis, Sofia Mitaku, Ioanna Chinou .Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* SpeciesOctober (2001)Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(9): P 4168-70.
47. Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols, 3(2), P 163–175.
48. Dubale, S., Kebebe, D., Zeynudin, A., Abdissa, N., & Suleman,S.au Journal of Experimental Pharmacology, volume 15 (pages 51–62), a été publié le 8 février 2023 (accepté le 24 janvier 2023)

49. Karumi, Y., Kaposhi, M., Mwanza, A. M., & Yeboah, S. O. (2004). Antibacterial activity and phytochemical screening of selected medicinal plants used in the management of oral infections in Zambia. *Pharmaceutical Biology*, 42(1), P15–19.
50. Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (2e éd.). Paris, France : Lavoisier.
51. Qualitative and quantitative estimation of terpenoid contents in some important plants of Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Science*, 69(2), P 150–155, a été publié en juin (2017).
52. Ahmed, Z., Aziz, S., Hanif, M., Mohiuddin, S. G., Khan, S. H. A., Ahmed, R., Sheikh Ghadzi, S. M., & Bitar, A. N. (2020). Phytochemical screening and enzymatic and antioxidant activities of *Erythrina suberosa* (Roxb) bark. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(2), P 192–200.
53. Moutounet, M. (1981). Dosages des polyphénols des moûts de raisin. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 15(4), P 287–301.
54. Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., & Mesbah, S. (2018). Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa atropurpurea* sub. *maritima* L. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 87, Article 7398.
55. Djamilatou, Z. S., Djibo, A. K., Sahabi, B., & Seini, S. H. (2021). Screening phytochimique, dosage des polyphénols et détermination de l'activité antioxydante de deux plantes anti-hypertensives du Niger. *European Scientific Journal*, ESJ, 17(17), P 335.
56. Vasquez Roncero A, Janer Del Valle C, Janer Del Valle ML. (1973). Determinacion de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites*, 24(6): P 350–357.
57. Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), P 555–559.
58. Zhang, Q., Yang, W., Liu, J., Liu, H., Lv, Z., Zhang, C., Chen, D., & Jiao, Z. (2020). Identification of six flavonoids as novel cellular antioxidants and their structure-activity relationship. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, Article ID 4150897.
59. Sauvage paysan, «Hydrolysable tannin—an overview», *ScienceDirect Topics* (consulté le 23 juin 2025).

Annexe 1 : Appareillage, verreries, réactifs et solution

Appareillage	Verreries et autres	Réactifs et solutions
-Appareil de Clevenger	-Ballon (2L -500ml – 250ml)	- Chloroforme
-Micropipette	-Ampoule a décanté	- Méthanol
-Chauffe ballon	-Pipette pasteur	- D'hydroxyde de potassium
-Elévateur	-Bécher (10ml-50ml-100ml-250ml-500ml-1L)	- Phénolphtaléine
- évaporateur rotatif	-Erlenmeyer (100ml – 1L)	- Ethanol
-Bain-marie	- Dessiccateur	- Acide chlorhydrique
-Etuve d'incubation	-Entonnoirs	- Acide sulfurique
-Agitateur	- Pycnomètre	- Réactif de Mayer
-Plaque chauffante	-Thermomètre	- Réactif de Dragendorff
- Réfrigérant	- Les tubes	- Fragments de magnésium
-Microplaque	-Seringue	- Chlorure ferrique
-Lecteur d'ELISA	-Papier filtre	- Réactif de Fehling A et B
-PH mètre	-Papier aluminium	- Réactif de Folin-Ciocalteu
-Hotte	-Fiole jaugée (10ml-25ml-50ml-100ml-1000ml)	- Acide gallique
-Ciseau	-Flacon en verre fumé et hermétique	- Solution de Na ₂ CO ₃
-Balance analytique	- Burette graduée	- Solution d'AlCl ₃
-Balance électronique	-Eprouvette (10ml-50ml-100ml-250ml)	- Solution quercitrine
- Spectromètre de masse UV-VIS	-Vials	- Solution de DPPH
- Un bec Bunsen		- Charbon actif
		- Solution d'hydroxyde de sodium
		- Milieu de culture LB (Luria-Bertani)
		-DMSO

Annexe 2 : Hydrodistillation par Clavenger



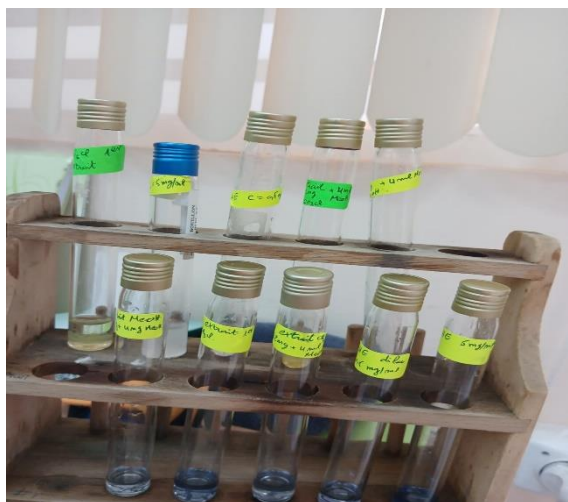
Annexe 3 : Dessiccateur et évaporateur rotatif



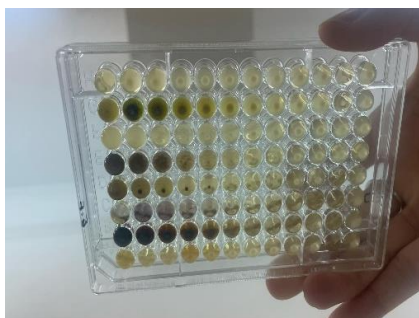
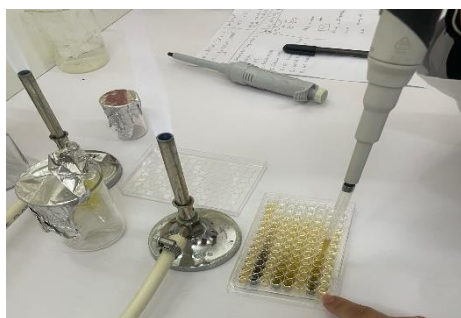
Annexe 4 : Le titrage des indices.



Annexe 5 : Les tubes de dosage polyphénol et flavonoïde et spectromètre de masse UV-VIS.



Annexe 6 : Pipettes automatiques et microplaque à 96 puits et vials de laboratoire.



Annexe 7 : Les souches bactériennes et un bec Bunsen pour produire une flamme stérile.

