

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA

F.S.D.....N° D'ordre :



Faculté des Sciences
Département de Chimie

Mémoire Présenté par

SEFSAF HAFIDHA

En vue de l'obtention
Du diplôme de Master en chimie

Option : Chimie des Substances Naturelles

THEME

**Etude de la composition chimique et de l'activité
biologique de l'huile essentielle et des extraits de
l'espèce *Origanum majorana* (Lamiaceae)**

Soutenu le 29 juin 2016, devant le jury composé de :

M^{me} Z. Zeffouni
M^{me} N. Bouzidi
M^{me} O. Touafek

MAA à l'Université de Blida
MCA à l'Université de Blida
MCB à l'Université de Blida

Président
Examinatrice
Promotrice

Promotion 2015-2016

Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde, mes chers parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

- Mes très chers frères Mustapha ; Mohamed ; Hamza ; Abderrahmane.

- Mes très chères sœurs Maeryem ; Djamila ; Zahia.

- Mes chers oncles ; tantes ; cousins et cousines.

A toute ma famille, surtout à mes neveux et mes nièces : Zakaria ; Abdeslam ; Kawthar ; Mouman ; Amine et Sirine.

Ainsi que pour toutes mes amies de ma promotion de Master chimie des substances naturelles

HAFIDHA

Remerciements

En premier lieu, je remercie ALLAH, le tout puissant qui m'a donné le courage, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

Tout d'abord, je tiens à remercier vivement ma promotrice Mme TOUAFEK Ouassila, Maitre de conférences à l'université de Blida, pour ses précieux conseils et ses encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.

J'adresse également de vifs remerciements à Mr M. EL-HATTAB, Professeur à l'université de Blida, pour l'aide considérable en faisant l'analyse GC-MS.

Je tiens à remercier M^{me} Z. Zeffouni, Maitre de conférences à l'université de Blida, d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de mémoire.

Mes remerciements vont également à Mme N. Bouzidi, Maitre de conférences à l'université de Blida, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je voudrais remercier également Mme Salma, biologiste au laboratoire d'hygiène de wilaya de Blida, pour son aide dans la réalisation de la partie activité antimicrobienne de ce travail.

Je remercie également tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour la réalisation de ce modeste travail.

En fin, je remercie tous les étudiants de ma promotion « chimie des substances naturelles »
2015/2016

Sommaire

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

Partie théorique : Aperçu bibliographique sur le genre *Origanum*

I-Présentation de la famille des Lamiacées.....	2
II-Aperçu bibliographique sur le genre <i>Origanum</i>	2
1-Présentation du genre <i>Origanum</i>	2
2-Répartition géographique du genre <i>Origanum</i>	3
3- Utilisation dans la médecine traditionnelle.....	4
4-Propriétés pharmacologique.....	4
5-Etude chimique antérieur sur les principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Origanum</i>	5
6- les huiles essentielles.....	9
III- Aperçu bibliographique sur l'espèce <i>Origanum majorana</i>	14
1-Présentation de l'espèce <i>Origanum majorana</i>	14
2- Place dans la systématique botanique.....	14
3-Propriétés pharmacologiques.....	15
4- Etude chimique antérieur sur les principaux métabolites secondaires de l'espèce <i>Origanum majorana</i>	16
5-Etude antérieur sur l'huile essentielle de l'espèce <i>Origanum majorana</i>	16

Partie expérimentale

Chapitre I : Etude phytochimique de l'espèce

Origanum majorana

I-Extraction de l'espèce <i>Origanum majorana</i>	21
1-Matériel végétal.....	21
2-Protocole d'extraction.....	21
3- Chromatographie sur couche mince CCM.....	22
4- Identification préliminaire des flavonoïdes.....	25
5- Fractionnement de l'extrait éthanolique.....	27

II-Extraction de l'huile essentielle.....	29
1- Principe.....	29
2-Protocole expérimental.....	29
3-Calcul du rendement de l'huile essentielle.....	30
4- Analyses GC et GC/MS.....	31

Chapitre II: Etude de l'activité biologique de l'espèce

Origanum majorana

I- Dosage des phénols totaux.....	35
1- Principe.....	35
2- Protocole expérimentale.....	35
3- Résultats de dosage des phénols par le réactifs de Folin-Ciocalteu.....	36
II-Etude de l'activité anti-oxydante de l'espèce <i>Origanum majorana</i>	37
1-Principe du test au DPPH.....	37
2-Protocole expérimental.....	39
3- Résultats de l'activité anti-oxydante testée par la méthode du DPPH.....	40
III- Etude de l'activité antimicrobienne de l' <i>Origanum majorana</i>	42
1-Introduction	42
2- Principe.....	43
3- Protocole expérimental.....	43
4-Résultats et discussion.....	46
Conclusion générale.....	49
Références bibliographiques.....	51
Annexes.....	60

Abréviations

Abc: Absorbance

ARP : Puissance Anti-Radicalaire(ou puissance antioxydante)

C: concentration

CCM :Chromatographie sur Couche Mince

CE₅₀: Concentration efficace médiane

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HE: Huile essentielle

MeOH : Méthanol

MH: Muller Hinton

NaOH : Hydroxyde de sodium

OmC : extrait chloroformique d'Origanum majorana

OmE : extrait éthanolique d'Origanum majorana

OmH : extrait hydrométhanolique d'Origanum majorana

mg: milligramme

µg: microgramme

nm: nanomètre

Rf: Rapport Frontal

SM: solution mère

UV: Ultra-Violet

%: Pourcentage

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Les propriétés pharmacologiques de quelques espèces d' <i>Origanum</i>	4
Tableau N°2 : Exemples de flavonoïdes isolés du genre <i>Origanum</i>	7
Tableau N°3 : Composants majoritaires (% > 4.0) d'huiles essentielles de quelques espèces du genre <i>Origanum</i>	10
Tableau N°4 : Composants majoritaires (% > 4.0) d'huile essentielle de l'espèce <i>Origanum majorana</i>	17
Tableau N°5 : La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce <i>Origanum majorana</i> récoltée à Tebessa.....	18
Tableau N°6 : La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce <i>Origanum majorana</i> récoltée à Khemis Miliana	19
Tableau N°7 : masse et rendement des extraits obtenus.....	22
Tableau N°8 : Les propriétés organoleptiques des extraits bruts de L' <i>Origanum majorana</i>	22
Tableau N°9 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits de l'espèce <i>Origanum majorana</i>	24
Tableau N°10 : La relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes	25
Tableau N°11 : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes	26
Tableau N°12 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait éthanolique.....	27
Tableau N°13 : Résultats de l'extraction de l' <i>Origanum majorana</i>	30
Tableau N°14 : Composition de l'huile essentielle de l'espèce <i>Origanum majorana</i>	31
Tableau N°15 : Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.....	36
Tableau N°16 : Variation des absorbances et Pourcentages de réduction du radical DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique et du standard.....	40
Tableau N°17 : Valeurs CE ₅₀ et ARP de l'extrait hydrométhanolique de l'espèce <i>Origanum majorana</i> et du standard antioxydant.....	41
Tableau N°18 : Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches.....	44
Tableau N°19 : les diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits, d'HE, de l'ATB et des ATFs relatives aux différentes souches microbiennes.....	46

Liste des figures

Figure 1 : Aire de distribution du genre <i>Origanum</i>	3
Figure 2 : Structure de base des flavonoïdes.....	5
Figure 3 : Structure de quelques flavonoïdes isolés du genre <i>Origanum</i>	7
Figure 4 : Structures des acides benzoïque et cinnamique	8
Figure 5 : Structure de carvacrol et thymol.....	13
Figure 6 : l'espèce <i>Origanum majorana</i>	15
Figure 7 : Protocole de préparation des extraits.....	21
Figure 8 : Les a chromatogrammes des extraits de l'espèce <i>Origanum majoran</i>	23
Figure 9 : le chromatogramme de la fraction F7 après révélation sous UV.....	28
Figure 10 : montage de l'hydrodistillation «Clevenger»	29
Figure 11 :Structure de deux composés majoritaire de l'espèce <i>Origanum majorana</i> .	33
Figure12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols.....	37
Figure13 : Réaction d'un antioxydant donneur d'hydrogène avec le radical DPPH•.....	38
Figure14 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'extrait hydrométhanolique et du standard.....	41
Figure 15 : Aromatogramme sur boite de pétri à diffusion à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle.....	44
Figure 16 : les diamètres des zones d'inhibition des extraits et d'HE relatives aux différentes souches microbiennes.....	46
Figure 17 : les diamètres des zones d'inhibition des extraits, HE, Cp, Mr et ApB relatives aux différentes souches microbiennes	47

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude de la composition chimique et l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'espèce *Origanum majorana*, qui appartient à la famille des Lamiaceae.

L'hydrodistillation de la partie aérienne de la plante fraîche et sèche a permis d'obtenir l'huile essentielle avec un bon rendement.

L'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana* fraîche a montré la présence de plus de 36 Composés dont les constituants majoritaires sont : 1-Chlorométhyl-1-(3,5-diméthylcyclohexyloxy)-1-silacyclohexane (15.29%) et l'estragol (9.95%).

Le fractionnement de l'extrait éthanolique de l'espèce *Origanum majorana* sur colonne de gel de silice a permis l'obtention après purification, d'un composé pur qui est en cours d'identification.

L'évaluation du contenu des composés phénoliques de l'extrait hydrométhanolique, en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé la présence de ces composés avec une teneur de 24mg EAG/ g d'extrait.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH de l'extrait hydrométhanolique a montré que cet extrait possède un pouvoir antioxydant important.

L'effet antimicrobien des extraits et de l'huile essentielle vis-à-vis 4 souches bactériennes et 2 souches fongiques a également été démontré.

Mots clés : *Origanum*, *Origanum majorana*, huile essentielle, chromatographie sur colonne, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique.

ملخص

كجزء من الترويج للنباتات الطبية في الجزائر، اهتمنا لدراسة نوع المردكوش ماجورانا الذي ينتمي إلى عائلة الشفوية.

استخرج الزيت العطري عن طريق التقطير بالبخار من الجزء الجوي للنبات الأخضر و الجاف أعطى مردود جيد.

تحليل GC / MS و GC للزيت العطرية من نوع المردكوش ماجورانا اثبت وجود اكثر من 36 مركب اغلبيتها هي 1-كلورو-1-(3،5-silacyclohexane-1-dimethylcyclohexyloxy) -1 (15.29%) من (9.95% estragol) و 5-benzenesulfonylamino-pentanoic حامض 4- الأيزوبروبيل-4.23 benzylamide (%).

تجزئ استخلاص الايثانول من نوع المردكوش ماجورانا من العمود هلام السيليكا الذي يسمح بالحصول على مركب نقي في طريق تحديد هويته.

تقييم محتوى المركبات الفينولية من المستخلص الميثيلي، وذلك بالاعتماد على طريقة فولين-

Ciocalteu

أدى إلى وجود هذه المركبات بمحتوى 24 ملغ مستخلص حمض غاليتش / غرام من المستخلص.

اثبتت دراسة النشاط المضاد للاكسدة المستعملة على المستخلص الميثيلي من خلال طريقة تثبيط

الجزر الحر DPPH أن هذا المستخلص لديه القوة المضادة للأكسدة هامة.

بالنسبة للتجارب المضادة للميكروبات فقد بينت أن المستخلص و الزيت العطري لها تأثير هام بالنسبة

إلى أربعة سلالات بكتيرية واثنين من سلالات فطرية، كما وجدنا ان هذه الاخيرة هي فعالة ضد معظم

البكتيريا.

الكلمات المفتاحية: المردكوش، المردكوش ماجورانا، الزيت العطرية، اللوني العمود، المركبات الفينولية، والنشاط المضادة للأكسدة، مضاد للجراثيم، والنشاط المضادة للفطريات.

Abstract

The aim of this study is to evaluate *in vitro* the antioxidant and antimicrobial activity of the species *Origanum majorana*, which belongs to the family of Lamiaceae.

The steam distillation of the aerial part of fresh and dried plant has achieved the essential oil with a good yield.

GC and GC / MS Analysis of essential oil of the species *Origanum majorana* fresh showed the presence of more than 36 compounds, which the majority compounds are: 1-Chloromethyl-1- (3,5-dimethylcyclohexyloxy) -1- silacyclohexane (15.29%) and estragol (9.95%).

The fractionation of the ethanolic extract of the species *Origanum majorana* silica gel column allowed obtaining after purification, a pure compound which is being identified.

Evaluation of the content of phenolic compounds of the methanolic extract, using the reagent of Folin-Ciocalteu revealed the presence of these compounds with a content of EAG 24mg / g of extract.

Evaluation of antioxidant activity of the methanolic extract, using DPPH free radical trapping method showed that this extract has antioxidant power.

The antimicrobial effect of extracts and essential oil against four bacterial strains and two fungal strains was also demonstrated.

Key words: *Origanum*, *Origanum majorana*, essential oil, column chromatography, phenolic compounds, antioxidant activity, antibacterial, antifungal activity.

INTRODUCTION GENERALE

La plante est un organisme vivant qui existe depuis l'antiquité. Elle constitue un maillon très important et fondamental dans le cycle biologique de vie des autres organismes vivant tel que les animaux aussi bien les être humain [1].

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique possédant un très large éventail d'activités biologiques.

Les plantes médicinales et aromatiques demeurent une source inépuisable de substances biologiquement actives. Dans la majorité des pays du sud, ces plantes constituent une composante fondamentale dans les secteurs de santé et d'agro-alimentaire. Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments présentes sous diverses formes galéniques simples répondant à une réglementation précise en matière d'évaluation portant sur l'innocuité, l'efficacité thérapeutique et la stabilité. Ainsi, les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle des molécules naturelles bioactives [2].

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales, au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique, ses espèces sont très riches en huiles essentielles et sont utilisées en médecine populaire pour leurs propriétés antiseptiques, antidiarrhéiques et antibronchiques. À cet effet, et dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de notre pays, nous nous sommes intéressés à étudier l'espèce *Origanum majorana* (Lamiaceae). Le choix de cette plante a été justifié par le fait qu'elle est très utilisée dans la médecine traditionnelle Algérienne.

Le présent travail reforme deux parties :

- La première partie est une étude bibliographique sur la famille, le genre et l'espèce étudiée (*Origanum majorana*)
- La seconde partie comprend deux chapitres :
 - Le premier chapitre apporte l'étude expérimentale ; Extraction, Séparation et identification des métabolites secondaires.
 - Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de l'activité biologique (antioxydante et antimicrobienne) de l'espèce étudiée.

En fin, ce travail est achevé par une conclusion générale.

I- Présentation de la famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées est l'une des plus répandues dans le règne végétal. Cette famille comprend près de 6700 espèces regroupées dans environ 250 groupes [3]. La région méditerranéenne a été le centre principal pour domestication et culture de Labiatae. Lamiacée, caractérisée par des plantes productrices d'huiles essentielles.

Les genres les plus cités dans la littérature sont : *Salvia officinalis*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum* [4]. Ainsi que de nombreuses espèces du genre *Thymus* qui ont été abandonnées et étudiées de ce point de vue [5]. Un très grand nombre de genres de la famille des *Lamiacées* sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes et iridoïdes glycosylés et composés phénoliques [6].

C'est une famille d'une grande importance aussi bien pour son utilisation en industrie alimentaire et en parfumerie qu'en thérapeutiques. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant [4]. Il est bien connu que les huiles essentielles extraites des plantes de cette famille possédant des propriétés pharmacologiques tant sur le plan humain qu'industriel. De nombreuses propriétés leur sont conférées : anti-infectieuses, antispasmodique, antalgiques, toniques, digestives, cicatrisantes....

II-Aperçu bibliographique sur le genre *Origanum*

1- Présentation du genre *Origanum*

Le genre *Origanum* a été particulièrement étudié par Ietswaart [7] en 1980. Il reconnaît 3 groupes, 10 sections, 38 espèces, 6 sous-espèces, 3 variétés et 16 hybrides.

Certaines espèces sont endémiques à un pays. Par exemple *O. saccatum*, *O. boissieri*, *O. hypericifolium*, *O. sipyleum*, *O. acutidens*, *O. haussknechtii*, *O. brevidens*, etc... sont particulières à la Turquie, pays qui est considéré comme le centre génique du genre *Origanum* puisqu'il en possède 16 espèces [8].

Les espèces endémiques représentent 44,2 %, dont la Grèce compte 11 espèces [9].

En Algérie, le genre *Origanum* est représenté par deux espèces spontanées phylogénétiquement proches : *Origanum glandulosum* Desf, endémique Algéro-tunisienne et *Origanum floribundum* Munby, endémique Algérienne.

L'*Origanum* vient de deux mots grecs, "*oros*" qui veut dire montagne et "*ganos*" qui signifie éclat; ce mot signifierait "ornement des montagnes".

L'origan porte aussi les noms vulgaires de marjolaine sauvage, marjolaine bâtarde, marjolaine vivace, thym de berger ou origan commun. Il faut souligner que la distinction entre marjolaine et origan n'est pas toujours très claire dans la littérature et dans la pratique commerciale ; de nombreuses dénominations sont utilisées pour désigner les huiles essentielles d'origan et il y a souvent confusion entre genre et espèce.

De plus, le terme de marjolaine est réservé à l'espèce *Origanum majorana* Linnaeus désignée marjolaine des jardins.

Ce genre contient des plantes aromatiques et médicinales, ce sont de petits arbustes ou des herbes pérennes avec plusieurs tiges, feuilles ascendantes ou dressées, subsessiles ou pétiolées et des fleurs verticillées regroupées en épis denses ou en vrac, qui sont disposés dans une inflorescence paniculée ou corymbiforme [10].

2-Répartition géographique du genre *Origanum*

Le genre *Origanum*L. (Famille des Labiées) comprend environ 70 espèces, sous-espèces, variétés et hybrides, caractérisé par une diversité morphologique et chimique importante [10]. Le genre *Origanum* est largement présent dans les îles Canaries et les Açores, dans l'Europe du Nord et jusqu'à l'Est de l'Asie. On peut le rencontrer aussi en culture à Cuba ou dans l'île de la Réunion, mais la région méditerranéenne représente son aire de distribution la plus importante.

La plupart de ces espèces sont originaires du bassin méditerranéen. Environ 75% se trouvent dans l'Est méditerranéen et seulement quelques espèces se produisent dans la partie occidentale de la Méditerranée [10].

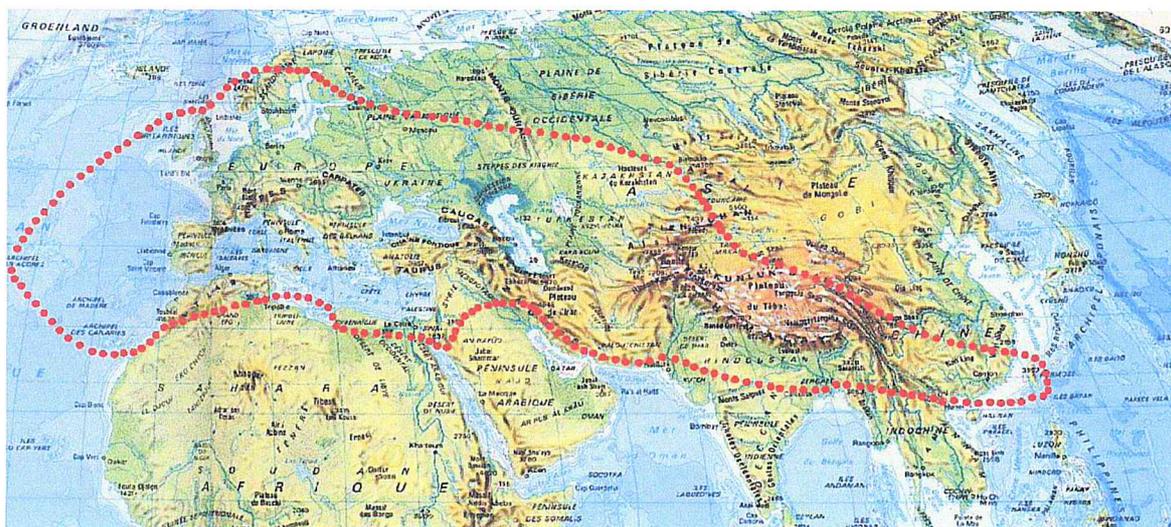


Figure 1 : Aire de distribution du genre *Origanum*

3- Utilisation dans la médecine traditionnelle

L'*origanum* est considéré comme une panacée. Il est largement utilisé en médecine populaire en raison de ses multiples effets thérapeutiques. Il est employé surtout, en infusions ou en décoction dans le traitement des dysenteries, des colites, des affections gastro-intestinales, de l'acidité gastrique et des affections broncho-pulmonaires, contre les rhumes, les gripes, les affections oto-rhino-laryngée (O.R.L.) et les bronchites. Il est utilisé en gargarismes contre les affections de la bouche (aphtes et gingivites) [11]. Enfin, il est employé comme tonique, aphrodisiaque et stimulant de l'appétit [11]. C'est aussi un condiment culinaire courant utilisé aussi comme conservateur pour le smen (beurre fondu).

4- Propriétés pharmacologiques

L'*Origanum* est doté d'activités antibactériennes [12] ; cytotoxique [13] ; insecticide [14], nématocide [15], antioxydant [13] et antithrombine [16].

Le tableau ci-dessous résume les propriétés pharmacologiques de quelques espèces d'*Origanum*.

Tableau N° 1 : Les propriétés pharmacologiques de quelques espèces d'*Origanum*

Espèces	Propriétés pharmacologiques	Référence
<i>O. compactum</i> Benth	antiviral, antibactérien, insecticide et antischistosomiase, Stomachique, digestive, vulnérable, aphrodisiaque, antispasmodique de toux, expectorant, hypoglycémiant, antiseptique, anti-inflammatoire, tonique, stimulant de l'appétit.	[17]
<i>O. elongatum</i> (Bonnet)	insecticide	[17]
<i>O. majorana</i>	antipyrétique, expectorante, sédative, antispasmodique intestinal, digestive, antiseptique, hypotensive, bactéricide, diurétique, calmant, tonique.	[17]
<i>O. onites</i>	Antimicrobienne	[18]
<i>O. vulgar</i>	antioxydantes, antifongiques, anti-inflammatoire	[18]
<i>O. hypericifalium</i>	Antifongiques	[18]
<i>O. syriacum</i>	Antimicrobienne	[18]

5- Etude chimique antérieure sur les principaux métabolites secondaires isolés du genre *Origanum*

- Les composés phénoliques

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisé en une dizaine de classe chimiques qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Il existe de nombreuses classes de polyphénols : phloroglucinols, quinones, stilbénoides, coumarines, anthocyanes, tanins, flavonoïdes, acides-phénols,...

Ces structures peuvent également être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures et de polarités.

Les composés phénoliques sont une famille thérapeutiquement et économiquement intéressante. Ils sont exploités en phytothérapie et dans des spécialités pour des propriétés vasculoprotectrices (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), antispasmodiques (phloroglucinols) et suscitent beaucoup d'intérêt par leur potentiel antioxydant.

a- Les flavonoïdes

Ce sont des pigments permettant la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigments. Ce sont des polyphénols ayant une structure de base en C6-C3-C6, constituée de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (Figure 2).

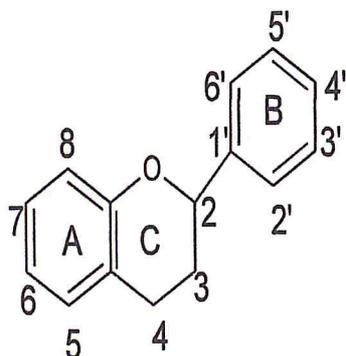


Figure 2: structure de base des flavonoïdes

On les classe en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central. On les distingue aussi par le nombre et la position des groupements hydroxyles, par l'existence ou non de substituant sur la génine [19]. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2 ou 3.

- Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé flavane.
- Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme isoflavane.
- Si la position 4 du flavane porte un groupement carbonyle, la molécule est appelée flavanone.
- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est en plus insaturée, le composé est nommé flavone.
- Si le squelette précédent est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle, il est désigné par le nom de flavonol [20].

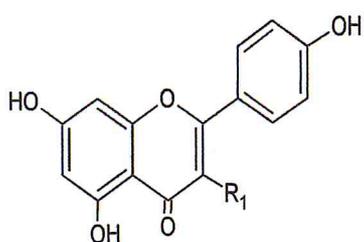
La principale propriété biologique reconnue des flavonoïdes est d'être « veino-actifs » (veinotrope, vitaminique « P ») c'est-à-dire qu'ils permettent de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance [19]. Par ailleurs, on attribue aux flavonoïdes de potentielles activités biologiques telles qu'anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anti-oxydantes et anti-cancérogènes.

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries [21].

Exemples de flavonoïdes isolés du genre *Origanum* sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau N° 2 : Exemples de flavonoïdes isolés du genre *Origanum*

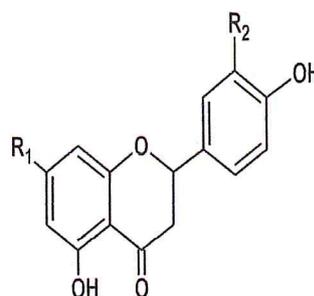
Composé	Espèce	Référence
Quercétine(1)	<i>O. vulgare</i>	[22]
	<i>O. majorana</i>	
	<i>O. calcaratum</i>	
	<i>O. elongatum</i>	
apigénine (2)	<i>O. vulgare</i>	[23]
Lutéoléine(3)	<i>O. vulgare</i>	
Naringénine (4)	<i>O. vulgare</i>	[22]
	<i>O. Majorana</i>	
	<i>O. dictamnus</i>	
	<i>O. dubium</i>	
ériodictyol-7- glucoside(5)	<i>O. vulgar</i>	[24]



(1) quercétine ($R_1 = R_2 = \text{OH}$)

(2) apigénine ($R_1 = R_2 = \text{H}$)

(3) lutéoléine ($R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$)



(4) Naringénine ($R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$)

(5) ériodictyol-7- glucoside ($R_1 = \text{GLC}, R_2 = \text{OH}$)

Figure 3: structure de quelques flavonoïdes isolés du genre *Origanum*

b- Acides phénoliques

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïque (C6-C1) et cinnamique (C6-C3) (Figure 4).

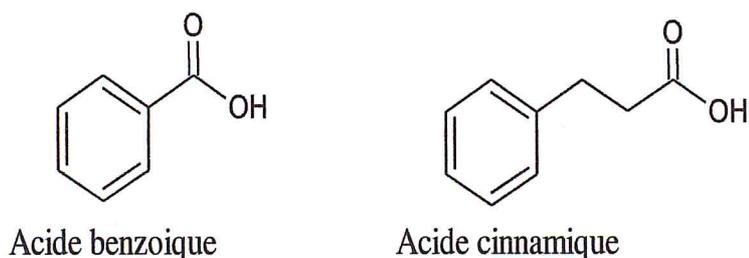


Figure 4 : Structures des acides benzoïque et cinnamique.

La plupart des acides-phénols dérivés de l'acide cinnamique (acides 4-coumarique, caféique, férulique et sinapique) ont une distribution très large, mais les autres (comme l'acide 2- coumarique) sont peu fréquents.

Ils sont rarement rencontrés à l'état libre et forment souvent :

- Des esters d'alcools aliphatiques (comme les acides mono-et dicaféyl-tartriques des Vitacées)
- Des esters de l'acide quinique (comme l'acide chlorogénique)
- Des depsides (comme l'acide rosmarinique), spécifiques des Lamiacées et des Boraginacées.

Ils peuvent également être acidifiés (comme des dérivés de la spermidine), ou combinés avec des sucres: esters du glucose ou éther du glucose.

Le rôle physiologique et/ou écologique des acides-phénols est très mal connu. Leur intérêt thérapeutique potentiel est très limité : propriétés antiseptiques urinaires de l'arbutine, propriétés anti-inflammatoires des dérivés salicylés. Par ailleurs, plusieurs composés acides phénoliques sont antibactériens et antifongiques, en particulier à l'égard des organismes phytopathogènes [25].

L'acide 3-O-caféoylquinique, acide protocatéchique, et L'acide rosmarinique sont des acides phénoliques présents dans l'espèce de *l'Origanum vulgare*[26].

6- Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe, renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation [27].

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois, elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal. Elles sont odorantes et très volatiles.

Les huiles essentielles sont rencontrées dans diverses familles botaniques, elles sont largement répandues dans le monde végétal et se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles [28].

Actuellement, on compte environ 800.000 espèces végétales et parmi elles, seulement 10% sont capables de synthétiser une essence, c'est-à-dire les plantes aromatiques [29].

Ces essences se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante, dans une même plante, ces huiles peuvent exister à la fois dans différents organes, où la composition chimique peut varier d'un organe à un autre. Ces essences aromatiques sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toute la partie de la plante [27].

L'huile essentielle du genre *Origanum* est riche en phénols, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes oxygénés, hydrocarbures monoterpéniques et hydrocarbures sesquiterpénique.

La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle des plantes du genre *Origanum* a fait l'objet de plusieurs travaux, dont nous résumons quelques-uns dans le tableau suivant :

Tableau N° 3 : Composants majoritaires (% > 4.0) d'huiles essentielles de quelques espèces du genre *Origan*

Espèce	Localité	Composé	Pourcentage %	Référence
<i>O. calcaratum</i>	Grèce	Thymol	40.6	[30]
		Carvacrol	16.5	
		<i>p</i> -cymène	12.0	
		γ -terpinène	9.1	
		géraniol	3.6	
<i>O. cordifolium</i>	Chypre	α -terpinéol	46.5	[30]
		bornéol	8.2	
		Carvacrol	7.6	
		γ -terpinène	6.0	
		<i>p</i> -cymène	5.1	
		comphène	4.1	
		terpinèn-4-ol	3.4	
<i>O. dictamnus</i>	Grèce	carvacrol	71.8	[31]
		<i>p</i> -cymène	26.0	
		thymoquinone	13.0	
		linalol	5.2	
<i>O. saccatum</i>	Turquie	<i>p</i> -cymène	83.7	[32]
		γ -terpinène	3.6	
<i>O. solymicum</i>	Turquie	<i>p</i> -cymène	53.0	[33]
		Thymol	9.3	
		bornéol	7.2	
<i>O. libanoticum</i>	Liban	Méthyl-thymol	32.8	[34]
<i>O. hypericifolium</i>	Turquie	Thymol	59.3	[35]
		<i>p</i> -cymene	18.1	
		α -terpinène	6.9	
<i>O. acutidens</i>	Syrie	carvacrol	67.5	[36]
		<i>p</i> -cymene	14.0	
<i>O. bargyli</i>		<i>p</i> -cymene	20.7	

	Turquie	carvacrol	14.7	[37]
		γ -terpinène	12.9	
<i>O. leptocladum</i>	Turquie	<i>p</i> -cymène	48.0	[38]
		carvacrol	14.6	
		bornéol	10.8	
<i>O. rotundifolium</i> Boiss	Turquie	β -caryophyllène	15.7	[39]
		<i>trans</i> -hydrate de sabinène	13.7	
		germacrène-D	8.9	
		Linalol	8.5	
		Bicyclogermacrène	7.9	
		bornéol	4.8	
<i>O. microphyllum</i>	Crète	terpinèn-4-ol	25.0	[40]
		Sabinène	14.7	
		Linalol	11.2	
		α -terpinène	6.7	
		<i>p</i> -cymène	5.9	
		β -caryophyllène	4.7	
<i>O. minutiflorum</i>	Turquie	Carvacrol	83.6	[41]
<i>O. dubium</i>	Chypre	Carvacrol	81.0	[42]
		Linalol	35.5	
		1,8- cinéole	32.2	
		<i>p</i> -cymène	6.0	
<i>O. onites</i>	Grèce	Carvacrol	80.0	[43]
<i>O. syriacum</i>	Égypte	Thymol	76.7	[44]
<i>O. dayi</i>	Palestine	1,8-cinéole	25.9	[45]
		terpinèn-4-ol	16.1	
		α -terpinéol	14.5	
<i>O. ramonense</i>	Palestine	α -terpinéol	41.5	[46]
		terpinèn-4-ol	16.8	

<i>O. elongatum</i>	Maroc	Carvacrol	79.2	[30]
		<i>p</i> -cymène	6.1	
<i>O. grosii</i>	Maroc	carvacrol	47.7	[47]
		<i>p</i> -cymène	13.7	
		thymol	12.7	
		α -terpinène	10.4	
<i>O. vulgare</i>	Crète	carvacrol	72.0	[48]
		<i>p</i> -cymène	28.7	
		α -terpinène	5.2	
<i>O. vulgare</i> L. ssp. <i>vulgare</i>	France	sabinène	16.3	[49]
		germacrène-D	13.3	
		β -caryophyllène	10.7	
		spathuléol	8.6	
		oxyde de caryophyllène	5.6	
		terpinèn-4-ol	4.8	
<i>O. vulgare</i> L. ssp. <i>gracile</i>	Turquie	carvacrol	73.8	[50]
		<i>p</i> -cymène	5.4	
		γ -terpinène	4.6	
<i>O. vulgare</i> L. ssp. <i>viride</i>	Turquie	thymol	69.1	[34]
		carvacrol	11.3	
<i>O. compactum</i>	Maroc	carvacrol	55.9	[51]
		γ -terpinène	15.1	
		<i>p</i> -cymène	8.6	
<i>O. ehrenbergii</i>	Liban	carvacrol	71.4	[30]
		<i>p</i> -cymène	7.0	
		γ -terpinène	6.0	
<i>O. laevigatum</i>	Turquie	germacrène-D	24.7	[52]
		bicyclogermacrène	20.1	
		β -caryophyllène	17.0	
		Spathuléol	5.0	

<i>O. X majoricum</i>	France	Carvacrol	29	
		<i>trans</i> -hydrate de sabinène	27.8	
		terpinèn-4-ol	8.0	
		γ -terpinène	6.4	
		Sabinène	5.5	
<i>O. X minoanum</i>	Crète	Carvacrol	27.6	[30]
		<i>p</i> -cymène	17.2	
		γ -terpinène	11.6	
<i>O. X intercedens</i>	Turquie	Carvacrol	72.9	[53]
		<i>p</i> -cymène	7.6	
		γ -terpinène	4.3	
<i>O. glandulosum</i>	Constantine	Thymol	70.59	[54]
		Carvacrol	5.44	
		γ -terpinène	5.04	
<i>O. floribundum</i>	Lakhdaria	Thymol	33.6	[55]
		γ -terpinène	19.9	
		<i>p</i> -cymène	15.5	
	Algérie	γ -terpinène	34.1	
		<i>p</i> -cymène	27.6	
		Carvacrol	9.6	

D'après la littérature, les travaux étudiés ont montrés que la composition chimique de l'huile essentielle de quelques espèces du genre *Origanum* est identifiée par deux chémotypes : carvacrol (6) et thymol (7).

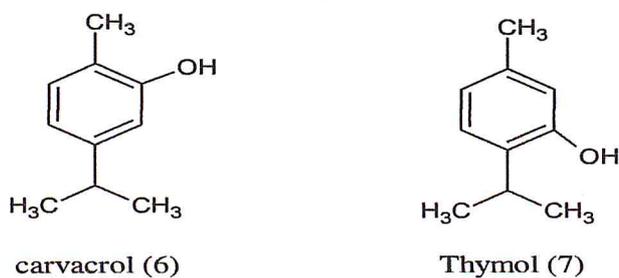


Figure 5 : structure de carvacrol et thymol

III-Aperçu bibliographique sur l'espèce *Origanum majorana*

1- Présentation de l'espèce *Origanum majorana*

La marjolaine (*Origanum majorana*) est une plante annuelle de la famille des Lamiacées, cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles aromatiques. C'est une espèce, très proche de l'origan, qui possède des feuilles de 1 à 2 cm de long, opposées, d'un vert grisâtre, de forme ovale entière. Ses fleurs sont petites, blanches ou mauves, disposées en groupes serrés à l'aisselle des feuilles avec deux bractées en forme de cuillère [55]. La récolte s'effectue lorsque les fleurs sont épanouies.

L'*Origanum majorana* est une espèce cultivée, endémique et pousse spontanément dans le nord de l'Afrique (en Algérie et en Tunisie en particulier).

2- Place dans la systématique botanique

Origanum majorana répertoriée comme suit :

Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Gamopétales
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiaceae
Sous-famille :	Népétoïdées
Genre :	<i>Origanum</i>
Espèce :	<i>majorana</i> [56]

➤ Noms vernaculaires

Nom français : La marjolaine

Nom arabe : Merdgouche, Merdgoucha, Berdgouche « بردقوش, مردقوشة, مردقوش »

Nom scientifiques : *Origanum majorana* [56]



Figure 6: l'espèce *Origanum majorana*

3- Propriétés pharmacologiques

Cette herbe s'emploie sous forme de feuilles fraîches ou séchées, seule ou en mélange avec d'autres herbes, pour aromatiser de nombreuses préparations culinaires (soupes et en particulier avec les viandes et les poissons grillés). La marjolaine est une plante aromatique très utilisée en cuisine, notamment dans les mets culinaires méditerranéens, son huile essentielle est connue pour sa propriété antiseptique [57].

L'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana* est considérée comme un puissant antispasmodique stomachique, qui calme les spasmes et plus particulièrement ceux de l'estomac et du colon, son action laxative et digestive contribue au bien être digestif et intestinal [58].

Elle possède aussi des effets notables sur le système psycho-sensoriel. Elle est utilisée pour atténuer le rôle du système sympathique et pour favoriser l'action relaxante et reposante du système parasympathique [59].

Vu sa propriété antitoxique, elle est utilisée en applications locales sur les boutons pour inactiver le venin des insectes, inoculé par piqûre [60].

4- Etude chimique antérieure sur les métabolites secondaires de l'espèce *Origanum majorana*

Les études menées par shan [61] sur les extraits de la partie aérienne de l'espèce *Origanum majorana* ont montré la présence des acides phénoliques : acide caféique, acide galique, acide cinnamique, l'acide carsonique, l'acide rosmarinique..., des flavonoïdes : l'apigénine, la lutéoline, la quercétine, la catéchine et leurs glycosides talques la rutine et l'isovetexine [61].

D'autre part, la lutéoline-7- Diglucoside, l'apigénine-7-glucoside, la diosmétine-7-glucuronide, le 6-hydroxylutéoline, le 6-hydroxyapigénine, l'arbutine et le méthylarbutine sont présents en tant que flavonoïdes glycosides dans la marjolaine.

Par ailleurs, l'étude chimique de l'espèce *Origanum majorana* effectuée par Dorman [62] a révélé la présence des triterpenoides telques : le β -sitostérol, l'acide oléonalique, et l'acide ursolique.

5- Etude antérieure sur l'huile essentielle de l'espèce *Origanum majoran*

L'huile essentielle d'*origanum majorana* est particulièrement riche en terpinéol. Elle a un aspect liquide, limpide, une couleur jaune pâle à foncé et une odeur douce, fine, chaude et délicate. Elle est obtenue par distillation de ses sommités fleuries et de ses feuilles.

L'analyse GCMS effectuée sur l'huile essentielle de l'*Origanum majorana* récoltée dans la région de Tbesa, Algérie a montré la présence des monoterpénoïdes, des sesquiterpenoïdes, monoterpènes oxygénés, et de sesquiterpènes oxygénés [63].

Les composants majoritaires d'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana* sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau N° 4 : Composants majoritaires (% > 4.0) d'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana*

Localité de l'espèce	Composé	Pourcentage %	Référence
Canada	terpinèn-4-ol	38.33	[41]
	α -terpinène	18	
	γ -terpinène	12.51	
	cis-terpinéol	11	
	Acétate de Myrcényl	4.54	
France	terpinèn-4-ol	47.1	[41]
	cis-hydrate de sabinène	14.9	
	<i>p</i> -cymène	14.3	
	sabinène	4.9	
	α -terpinéol	4.6	
Liban	α - Cariophyllene	30.0	[64]
	<i>p</i> -cymène	14.0	
	γ -terpinène	9.0	
	Sabinène	6.70	
	Linalol	5.60	
	α -terpinéol	4.20	
Maroc	4-terpinène	28.96	[65]
	γ -terpinène	18.57	
	α -terpinène	12.72	
	Sabinène	8.02	
	Acétate de linalyle	5.63	
	Terpinolene	4.06	
Brésil	Terpinèn-4-ol	26.0	[66]
	Cis-sabinene	13.3	
	γ -terpinèn	5.8	

L'étude menée par Hadeff et al. [63] sur la composition chimique de l'huile essentielle de l'*Origanum majorana* récolté à Tebessa (Algérie) a montré que cette huile contient comme composés majoritaires le *p*-Menth-1-en-4-ol, (R), et le γ -terpinène, α -terpinène, et le *cis*-terpinéol, β -phélandrene

Les composants de l'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana* récoltée à Tbessa sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau N° 5 : La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana* récoltée à Tebessa [63].

Composé	Pourcentage%
<i>p</i> -Menth-1-en-4-ol, (R)	21.0
γ -terpinène	19.0
α -terpinène	15.0
<i>Cis</i> -terpinéol	11.0
β -phélandrene	6.0
<i>p</i> -Mentha-1,4(8)-diene	5.0
4-Isopropogenyl-methylcyclohexanol	3.0
camphre	3.0
4-Isopropyl-1 methyl-2-cyclohexen-1-ol	1.0
<i>trans p</i> -Menth-1-en-3-ol	1.0
Caryophyllene	1.0
acétate de bornyle	1.0
<i>o</i> -Menth-8-ene, 4-isopropylidene-1-vinyl	<1
1,5-Heptadiene, 6 methyl-2-(4-methyl-3-cyclohexen-1-yl)-, (S)	<1
Spathulenol	<1
Carotol	<1

Par ailleurs, l'étude de brada et al. [67] de la même espèce récoltée à Khemis Miliana a montré comme composé majoritaires le β -Caryophyllène, α -terpinolène, γ -terpinène, Sabinène.

Les composants de l'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana* récoltée à Khemis Miliana sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau N° 6 : La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana* récoltée à Khemis Miliana [67].

Composé	Pourcentage %	Composé	Pourcentage %
α -terpinolène	14.7	Cis-p-Menthe-2-en-1-ol	0.4
γ -terpinène	10.9	allo-ocimène	0.4
Sabinène	9.5	Alloaromadendrene	0.4
Myrcène	4.7	Spathulenol	0.4
α -terpinène	3.9	α -Eudesmol	0.3
Acétate de bornyle	3.3	α -Humulène	0.3
<i>p</i> -cymène	3.0	α -Terpineol	0.3
Acétate de linalyle	3.0	terpinèn-4-ol	0.3
Linalool	2.7	Viridiflorol	0.2
Limonène	2.7	Camphor	0.2
Acétate de geranyle	2.3	Trans-Dihydrocarvone	0.1
Oxyde caryophyllène	1.3	Acétate néryle	0.1
γ -cadinène	0.7	α -amorphène	0.1
Aromadendrene	0.7	<i>cis</i> -Thujone	< 0,1
α -pinène	0.5	α -Gurgunène	< 0,1

Les études menées sur la composition de l'huile essentielle de marjolaine ont montrés que le composé majoritaire et le γ -terpinènesuivi par le α -terpinéolène, le α -terpinène, le (R) *p*-Menth-1-en-4-olet le Cis-terpinéol.

Il est rapportée aussi dans la littérature [41], que l'huile essentielle de la marjolaine de canada est majoritairement composée de terpinène-4-ol (38,33%), α -terpinène(18%), γ -terpinène (12.51%) et Cis-terpinéol (11%).Et

Trois composés majoritaires, le Terpinèn-4-ol (26.0%), le Cis-sabinene (13.3%), et le γ -terpinèn (5.8%)ont été déterminés dans de cette espèce cultivée en Brésil [66].

L'huile essentielle de la marjolaine française [41] est également composée de terpinèn-4-ol (47.1%) comme produit majoritaire; les autres composés sont : le *cis*-hydrate de sabinène (14.9%), le *p*-cymène (14.3%), le sabinène (4.9%) et le α -terpinéol (4.6%).

Par ailleurs,les principaux constituants de l'huile essentielle de la marjolaine cultivée en Liban [64], ont été déterminés comme étant, le β - Cariophyllene (30.0%), le *p*-cymène (14.0%), le γ -terpinène (9.0%) et le Sabinène (6.70%).

Six composés majoritaires de l'huile essentielle de l'*Origanum majorana* du Maroc, le 4-terpinène (28.96%), le γ -terpinène (18.57%), le α -terpinène (12.72%), le Sabinène (8.02%), l'acétate delinalyle (5.36%) et le terpinolene (4.06%) ont été rapportés [65].

D'autre part, les deux études effectuées sur l'huile essentielle de la plante sèche « *Origanum majorana* » de l'Algérie, ont montré une composition très différente, car les composés majoritaires de l'espèce récoltée à Tébessa [63] sont : le (R) *p*-Menth-1-en-4-ol (21%), le γ -terpinène (19%) et le α -terpinène (15%). Par contre, ceux déterminés dans l'espèce récoltée à Khemis Miliana [67] sont : β - Cariophyllene (26%), le α - terpinolene (14.7%), le γ -terpinène (10.9%) et le Sabinène (9.5%).

De façon générale, l'étude chimique de l'espèce *Origanum majorana* a montrée que la composition de l'huile essentielle est riche en monoterpènes oxygénés, hydrocarbures monoterpéniques et en hydrocarbures sesquiterpéniques.

Partie expérimentale

Chapitre I
Etude phytochimique de l'espèce
Origanum majorana

I- Extraction de l'espèce *Origanum majorana*

1- Matériel végétal

La plante (*Origanum majorana*) a été récoltée en mois de mars 2016 dans la région de Khemis-Miliana, wilaya de AinDefla.

La matière végétale, fraîchement récoltée est séchée, à l'ombre pendant une semaine. broyé et conservé à l'abri de la lumière de l'humidité et la chaleur.

2- Protocole d'extraction

Nous avons procédé à l'extraction de métabolites secondaires de la plante sèche (feuilles + tige + fleures) par macération pendant 24 heures, une quantité de 60g dans des solvants à polarité différente Chloroforme, Ethanol et MeOH/eau (5/1).

La filtration puis l'évaporation du solvants à sec, nous permis d'obtenir les extraits : Chloroformique (OmC), Ethanolique (OmE) et hydrométhanolique (OmH).

En fin, les extraits obtenus sont pesés et le rendement est calculé selon la formule ci-dessous :

$$R(\%) = (M_{\text{extrait}} / M_{\text{échantillon}}) \cdot 100$$

Avec :

R(%) : rendement d'extraction en pourcentage ;

M_{extrait} : masse de l'extrait en gramme ;

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

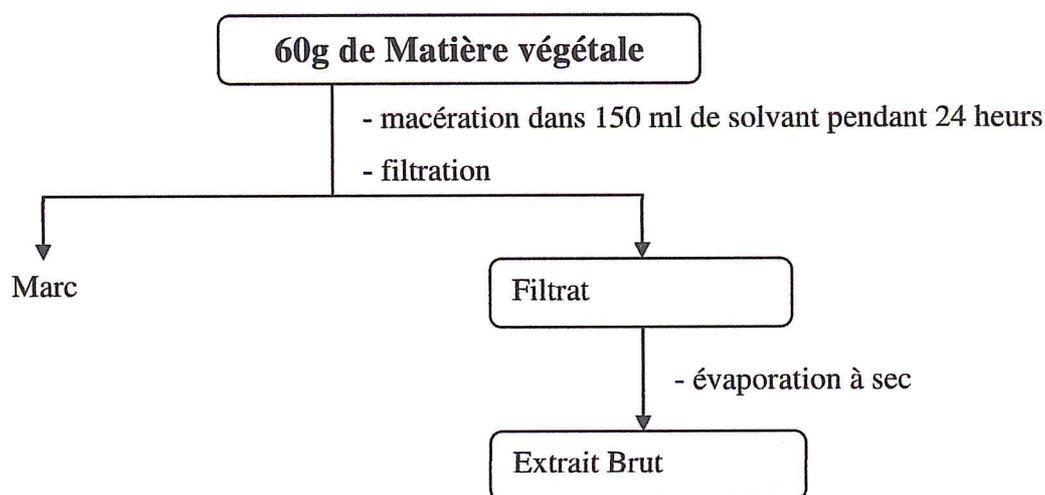


Figure 7 :Protocole de préparation des extraits

Les résultats obtenus (masse et rendement) sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N° 7 : masse et rendement des extraits obtenus

Extraits	Masse (g)	Rendement %
OmC	2.7	4.5
OmE	2.73	4.55
OmH	1.5	2.5

Les propriétés organoleptiques (aspect, couleur et odeur) de nos extraits sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau N°8: Les propriétés organoleptiques des extraits bruts de *L'Origanummajorana*

Extrait	Aspect	Couleur	Odeur
OmC	Visqueux	Ver foncé	Caractéristique
OmE	Pâteux	Verdâtre	Caractéristique
OmH	Pâteux	Marronfoncé	Caractéristique

3-Chromatographie sur couche mince CCM

La chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation des composés qui permet d'analyser la complexité d'un mélange. Cette technique a été utilisée pour visualiser la séparation des molécules de l'extrait.

✓ **Principe** : La chromatographie sur couche mince repose sur les phénomènes d'adsorption, d'interactions et de polarité.

Un mélange de composés est placé sur un support solide (phase stationnaire) qui est plongé dans un solvant (phase mobile) qui, par capillarité, se déplace le long de la phase stationnaire.

La phase mobile va entraîner les composés qui migreront à une hauteur variant en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile.

✓ Protocole expérimental

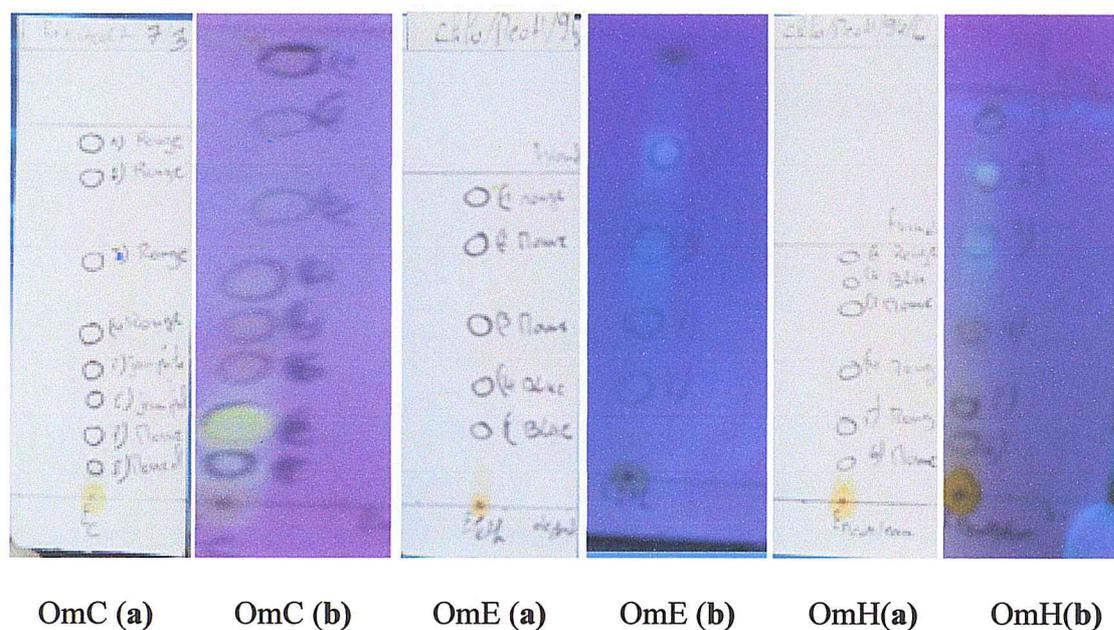
Les échantillons sont analysés en utilisant des plaques CCM commerciales prêtes à être utilisées, de gel de silice de dimension (20/20cm).

La cuve de migration est partiellement remplie du mélange de solvant(phase mobile) et recouverte, afin qu'elle soit saturée en vapeur d'éluant, ce qui facilite et améliore la migration. Une ligne de dépôt est tracée à 1,5 cm du bord, les extraits sont solubilisés dans le solvant approprié et déposés, puis la plaque est mise en contact avec la phase mobile dans la cuve jusqu'à migration de la phase mobile à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque.

Après plusieurs essais, on a pu mettre en évidence l'éluant qui donne une bonne séparation des composés de chaque extrait.

Après séchage, les chromatogrammes sont analysés à la lumière visible et sous UV (365nm), puis révélés par une solution éthanolique saturée de NaOH.

Les chromatogrammes des extraits avant et après révélation sont représentés ci-dessous :



a : Avant révélation ; b : Après révélation avec le NaOH

Figure 8: Les chromatogrammes des extraits de l'espèce *Origanum majorana*

✓ **Calcul du rapport frontal R_f**

Le Calcul du rapport frontal (R_f) est donné par la relation suivante :

$$R_f = D_c / D_s$$

Où :

D_c : la distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache) ;

D_s : la distance parcourue par le front du solvant.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par sa fluorescence sous UV et par son R_f (le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile c'est à dire le front du solvant) qui est compris entre 0 et 1.

Les résultats obtenus de la chromatographie sur couche mince des différents extraits sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau N°9: Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits de l'espèce *Origanum majorana*

Extraits étudiées	Système de solvants v/v (ml)	N° de spot	R_f	Couleur d spots	
				sous UV	après révélation
OmC	Hexane / Acétated'éthyle (7/3)	1	0.91	Rouge	-
		2	0.77	Rouge	-
		3	0.6	Rouge	-
		4	0.42	Rouge	-
		5	0.35	Jaune pâle	orange
		6	0.28	Jaune pâle	orange
		7	0.17	Violet	Jaune
		8	0.07	Violet	Jaune claire
OmE	Chloroforme / Méthanol	1	0.96	Rouge	-

	(98/2)	2	0.8	Violet	Jaune
		3	0.56	Violet	Jaune
		4	0.38	Blue	-
		5	0.21	Blue	-
OmH	Chloroforme / Méthanol (94/6)	1	0.9	Rouge	-
		2	0.76	Blue	Jaune
		3	0.6	Violet	Jaune
		4	0.4	Rouge	orange
		5	0.2	Rouge	-
		6	0.1	Violet	Jaune

4- Identification préliminaire des flavonoïdes

✓ Relation entre structure et Rf

La distance de migration des substances dépend essentiellement de leur polarité :

- Les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de Rf (0,00-0,25)
- Les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de Rf comprises entre (0,3-0,5)
- Les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées de Rf (0,5-0,75) [68].

Tableau N°10 : La relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes [68].

Structure flavonique	Rf
Augmentation des (OH)	Diminution du Rf
Méthylation des groupements (OH)	Augmentation des valeurs de Rf
Acétylation	Augmentation des valeurs de Rf
Glycosylation	Diminution des valeurs de Rf due principalement de l'introduction de nouveaux groupements (OH)

✓ **Relation entre structure et fluorescence**

L'examen en lumière ultraviolette est la méthode la plus utilisée pour la détermination de la structure des flavonoïdes, le tableau N°11 résume la relation qui peut exister entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV.

Tableau N°11 : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes [69]

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6, 7, tri OH libres Flavonols 5, 7, 8, tri OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4' OH Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH Flavones 6 ou 8 OH Chalcones Dihydroflavonols Isoflavones Flavanones
Bleu claire (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substit
Jaune terne Jaune Fluorescence orange	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5-OH libre
Jaunevertbrillant	5 OH libre ou 5 OH substitue
jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone Flavanones
Jaunepale	Dihydroflavonols

Par comparaison avec la littérature [70], La présence des spots de coloration jaune, violette et bleu dans les chromatogrammes de nos extraits, indique la présence, dans l'espèce étudiée, des flavonols, des flavonones, des isoflavonones, des flavones, et dihydroflavonols.

5-Fractionnement de l'extrait éthanolique

✓ **Principe** : On utilise une colonne en verre équipée d'un fritté de verre et d'un robinet. La colonne est remplie d'une phase stationnaire de la silice. Un mélange de composés est placé en haut de la colonne. Selon la nature de l'éluant et du contenu de la colonne, certaines molécules sont plus facilement éluées que d'autres et la séparation des composés du mélange est ainsi permise.

✓ Protocole expérimental

Nous avons procédé au fractionnement de l'extrait éthanolique sur une colonne chromatographique de gel de silice.

2.7g de l'extrait sont dissous dans le MeOH, on lui ajoute quelques grammes de gel de silice. L'évaporation à sec, permet d'obtenir l'extrait sous forme solide. Ensuite, l'extrait est déposé sur une colonne de gel de silice et éluée par des solvants à polarité croissante. Des fractions de 20 ml sont recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince CCM en utilisant divers systèmes d'éluion.

Les plaques sont examinées sous UV (254 et 365 nm), puis révélées par une solution éthanolique saturé de NaOH.

Les fractions similaires sont réunies, évaporées et pesées, donnant ainsi 08 fractions.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°12 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait éthanolique.

Fractions	N° de fractions	Système d'éluion	Observations
F1	1-6	Chloroforme 100%	Mélange complexe
F2	7-12	Chloroforme 100%	Mélange séparable
F3	12-15	Chloroforme 100%	//
F4	15-18	Chloroforme/ Méthanol (99/1)	Mélange séparable
F5	18-21	Chloroforme / Méthanol(99/1)	//
F6	21-27	Chloroforme / Méthanol (99/2)	//
F7	27-31	Chloroforme / Méthanol (98/2)	Composé à purifier
F8	31-36	Méthanol 100%	Trainée

La plaque CCM de la fraction F7 issue de fractionnement de l'extrait éthanolique par Chloroforme / Méthanol (98/2) sur colonne de gel de silice, montre la présence d'une seule tache de coloration violet avec Traînée.

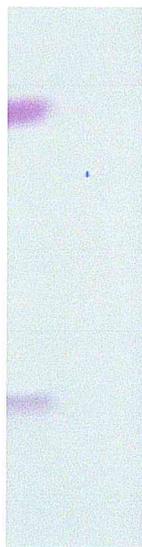


Figure 9 : le chromatogramme de la fraction F7 après révélation sous UV.

Par comparaison avec la littérature [70], la couleur violet correspond à la présence d'un flavonoïde (flavone ou flavonol substitué en position 3).

Le composé obtenu de la fraction F7 a été purifié par recristallisation dans le MeOH. Après filtration, lavage et séchage, on a obtenu 30mg de composé sous forme de poudre blanche.

En fin, le produit obtenu est en cours d'identification par d'analyse spectroscopique (UV et RMN).

II- Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana* a été obtenue par hydrodistillation, en utilisant un appareil de type Clevenger. L'extraction est effectuée durant trois heures, durée nécessaire à l'épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle.

1- Principe

Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Le mélange est ensuite refroidi et condensé dans un essencier. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une huile. L'huile essentielle obtenue est stockée dans des flacons codés, à 4°C et à l'obscurité dans l'attente de leur analyse.

2- Protocole expérimental

100g de matière végétale (partie aérienne : tiges, feuilles et fleurs) sont hydrodistillés dans un Clevenger, durant 3 h. L'huile essentielle obtenue, de couleur jaune et d'odeur très agréable, est conservée à +4°C jusqu'à son analyse GC-MS.



Figure 10: montage de l'hydrodistillation «Clevenger»

3- Calcul du rendement de l'huile essentielle:

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids d'huile extraite (M_{HE}) en (g) et le poids de la plante à traiter (M_{MV}) en (g).

Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$R\% = (M_{HE}/M_{MV}) \times 100$$

Les résultats du rendement de l'huile essentielle sèche et fraîche sont exprimés dans le tableau N°13.

Tableau N°13: Résultats de l'extraction de l'*Origanum majorana*

Matière végétale	La masse de l'HE en g	Rendement en %
Sèche	1.1	1.1
Fraiche	0.38	0.38

Le rendement en huile essentielle sèche et fraîche obtenu par hydrodistillation de la partie aérienne d'*Origanum majorana* est de l'ordre de 1.1% et 0.38% respectivement, de couleur jaune clair et d'une odeur aromatique. Cette valeur est comparativement la même à celle citée déjà dans la littérature (1.42% et 0.74%) [70].

Les résultats obtenus montrent que notre espèce «*Origanum majorana*» est riche en huile essentielle.

4- Analyses GC et GC/MS

4-1 Analyse GC

L'analyse GC a été effectuée sur un chromatographe Shimadzu GC équipé de détecteur QP, équipé d'une colonne capillaire de DB-5 (30 m x 0.25 mm i.d., épaisseur de film 0.25 µm). La température du four étant programmée de 90 à 250°C à une vitesse de 3°C min⁻¹, puis à une vitesse de 15°C min⁻¹ lorsque la température atteint 300°C, elle est enfin maintenue isotherme pendant 15 min à 300°C. Le gaz vecteur est l'hélium à 1ml.min⁻¹.

4-2- Analyse GC/MS

L'analyse GC/MS a été effectuée sur un appareil Shimadzu équipé d'une colonne capillaire de DB-5 (30 m x 0.25 mm i.d., épaisseur de film 0.25 µm) et un détecteur à ionisation de flamme. Les paramètres MS étant : - température du détecteur: 220°C-240°C - rapport split : 1:10 - potentiel d'ionisation : 70 eV

Les composants de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (RI) à leur MS avec les données (Librairies NIST et WILEY).

4-3- Résultats de l'analyse GC/MS et discussion

Plus de 24 composants, représentant de l'huile essentielle de l'*Origanum majorana* ont été identifiés (chromatogramme1). Cette huile est majoritairement composée de 1-Chloromethyl-1-(3,5-dimethylcyclohexyloxy)-1-silacyclohexane (15.29%), de l'Estragol (9.95%) et de 5-benzenesulfonylamino-pentanoic acid 4-isopropyl-benzylamide (4.23%).

Les Composés obtenus, listés selon leur ordre d'élution dans la colonne, sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°14 : Composition de l'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana*

N°	Composé	Pourcentage %	Temps de retention
1	trans-4-decenoate d'ethyle	0.13	3.130
2	acid 2,3-dimethoxy-, diethoxy butanedioique	0.54	3.214
3	(3β, 17β)-, 3-hydroxy-, spiro [androst-5- ene-17,1'-cyclobutan]-2'-one	0.38	3.236
4	cis-4-thujanol	0.41	4.020

5	Linalyl phenylacetate	0.56	4.096
6	α -terpinolene	1.96	4.368
7	γ -Terpinene	0.16	4.550
8	(1 α ,5. α ,6 β .)-6-ethenyl-2,6-dimethyl-, bicyclo [3.1.1] hept-2-ene	0.51	4.840
9	p-allyl-Anisole	0.15	4.985
10	1-methoxy-2-nitro-benzene,	0.22	5.025
11	α -Irone	0.12	5.085
12	D-Verbénone	0.17	5.295
13	cis-anethole	0.34	5.485
14	Estragol (8)	9.59	6.553
15	Thymol	1.04	7.153
16	5-methyl-2-(1-methylethyl)-phenol	0.17	7.345
17	trichloromethyl-silane	0.35	7.496
18	Carvacrol	0.23	7.571
19	(2,8-dimethyl-1-naphthalenyl)(4- methoxy-2,6-dimethylphenyl)-Diazene,	0.13	9.945
20	acid 2-(carboxymethyl-methyl-amino)- benzoïque	0.10	48.365
21	1-Chloromethyl-1-(3,5- dimethylcyclohexyloxy)-1- silacyclohexane (9)	15.29	54.962

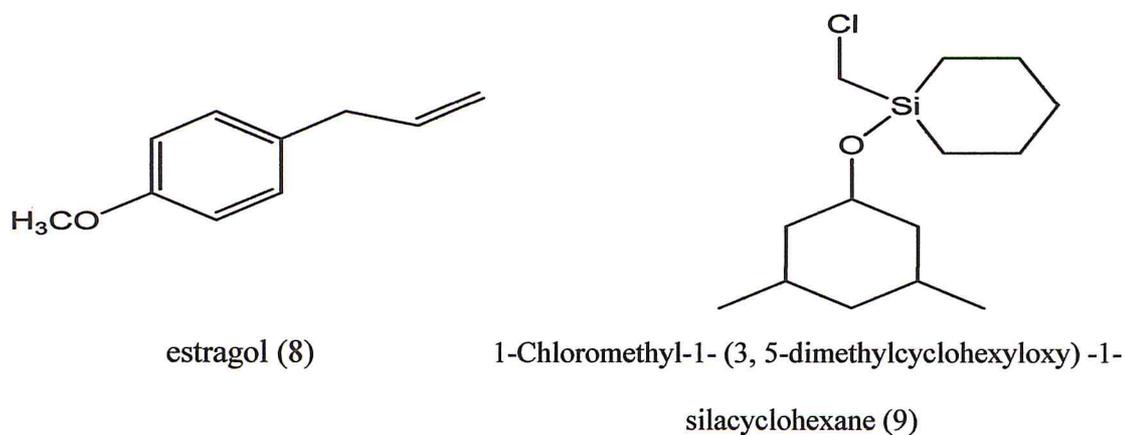
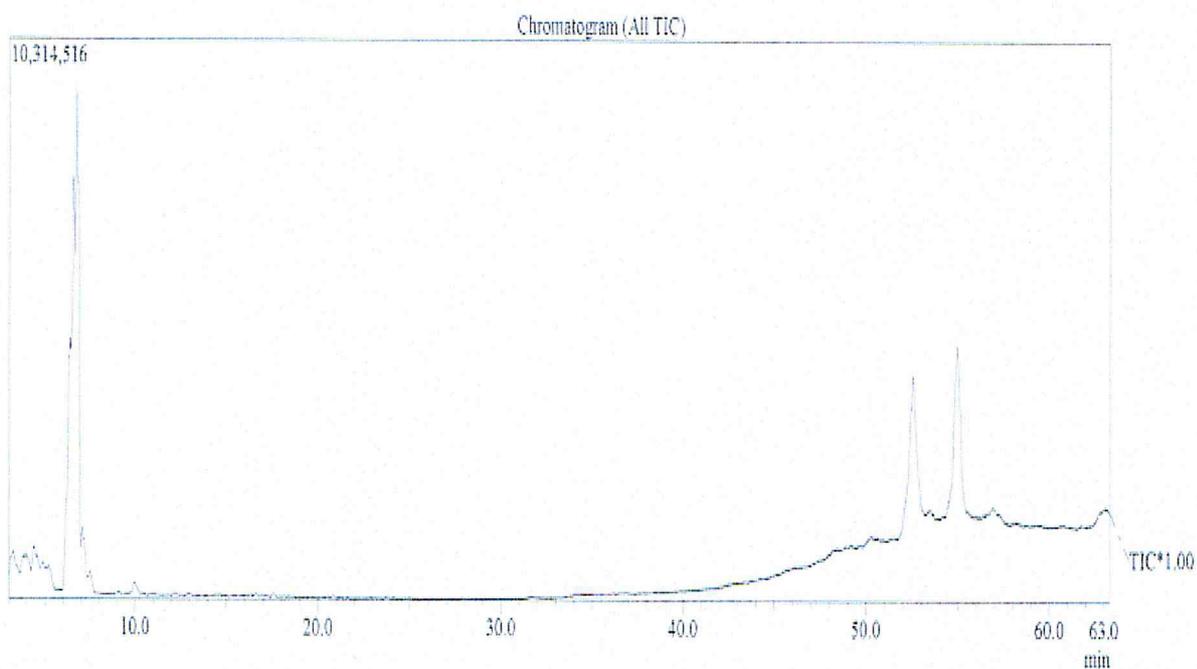


Figure 11 : structure de deux composés majoritaire de l'espèce *Origanum majorana*

C:\GCMSsolution\Data\Project1\new lab huile\tesTORG.QGD



Chromatogramme 1 : GC/MS de l'huile essentielle de *Origanum majorana*

D'après l'étude effectuée sur l'*Origanum majorana*, on peut conclure que les résultats obtenus de l'analyse GC et GC-MS de notre huile essentielle sont en accord avec la littérature [65], et [67]. (Présence de α -terpinolene), mais, ils sont complètement différentes avec ceux obtenus à partir des espèces récoltées en Algérie (Tebessa). Ceci peut être dues à plusieurs paramètres qui influent la composition, tels que la partie de la plante étudiée, la période de la récolte, le sol....

Chapitre II
Etude biologique de l'espèce
Origanum majorana

I- Dosage des phénols totaux

Les phénols produits par les végétaux en tant que métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules chimiques, dont leur nature chimique et teneur sont extrêmement variables d'une espèce à autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des phénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu est la plus utilisée [72].

1-Principe

Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Singleton et Ross (en 1965) avec le réactif de folin-Ciocalteu. Le réactif est formé d'acide phosphotungestique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3), ce qui nous aide à doser les phénols dans le visible à une longueur d'onde de 765 nm [73].

Après avoir tracé la droite d'étalonnage de ce dosage (absorbance en fonction des concentrations connues à partir d'une gamme étudiée); on peut déterminer graphiquement la concentration puis la teneur des composés phénoliques dans notre extrait.

2- Protocole expérimentale

2 mg de l'extrait hydrométhanolique de l'espèce *Origanum majorana* ont été mélangés avec 1 ml de Méthanol et 6.5 ml d'eau distillé. 1ml de cette solution a été mélangé avec 5ml eau distillée et 4ml de solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 7.5 g/ml, puis 0.5ml de réactif de Follin Ciocalteu a été ajouté au mélange. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 30 mn à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 765 nm. Le blanc de la réaction ne contenant pas de polyphénols est réalisé comme le point 0 mg /ml de la gamme.

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations, allant de 0.0156 à 0.121 mg/ml dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par 1g poids sec d'extrait hydrométhanolique (mg EAG/g d'extrait).

3- Résultats de dosage des phénols par le réactif de Folin–Ciocalteu

La quantité des composés phénoliques a été déterminée par la méthode de Follin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard, l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 765nm. Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux présentes dans l'échantillon.

La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les composés phénoliques pour les raisons suivantes ; c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, la disponibilité du réactif de Follin et la méthode est bien standardisée, la grande longueur d'onde (765 nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré, c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde [74].

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par une solution étalon (l'acide gallique) à différents concentration. Le tableau suivant enregistre les absorbances de l'acide gallique à chaque concentration:

Tableau N°15:Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.

C (mg/ml)	0.0156	0.0312	0.05	0.07	0.121
Abs	0.24	0.392	0.504	0.65	1.12

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée on prenant l'absorbance en fonction de chaque concentration (mg/ml) :

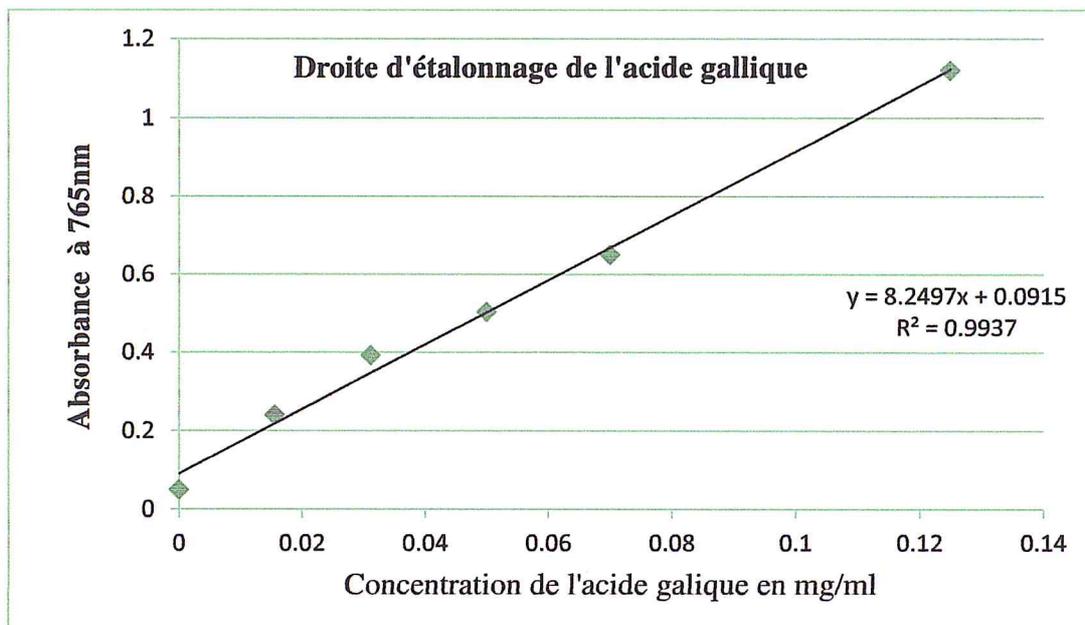


Figure N°12: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols

La concentration des phénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique ($Y=8.249X+ 0.091$) sachant que : $R^2=0,993$. En remplaçant le Y par l'absorbance de notre extrait qui a subi le même traitement que les solutions filles ($Abs_{\text{extrait}} = 0.420$) pour donner une valeur 24mg EAG/ g d'extrait.

Selon Siddhuraju, 2003 [75] la teneur des phénols existante dans l'*Origanum majorana* ne dépasse pas 5.20 mg. Donc la teneur dans notre extrait est supérieure à celle de littérature.

II- Etude de l'activité anti-oxydante de l'espèce *Origanum majorana*

Pour évaluer l'effet antioxydant de l'extrait hydrométhanolique de l'espèce *Origanum majorana*, nous avons utilisé la méthode au DPPH.

1- Principe du test au DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure activité antioxydante des composés phénoliques.

La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits phénoliques. Le DPPH est initialement violet, se décolore jaune lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques.

Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits.



Où AH est un composé capable de céder un H^{\cdot} au radical DPPH.

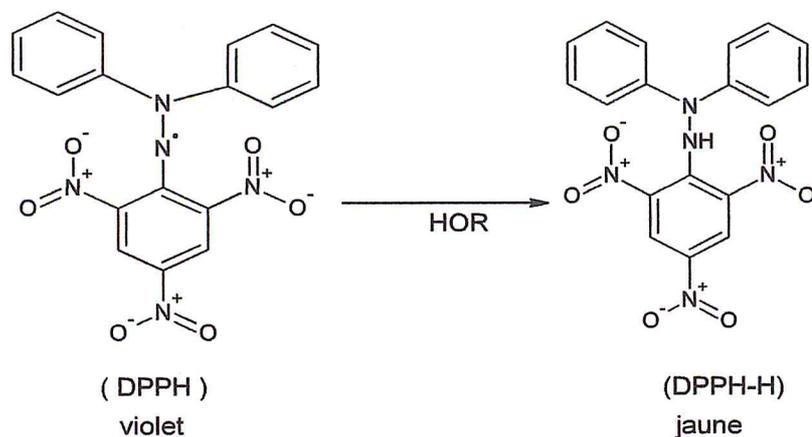


Figure 13: Réaction d'un l'hydrogène (antioxydante) avec le radical DPPH $^{\cdot}$

L'évaluation de l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_0 - A_1 / A_0)] \cdot 100$$

Avec :

A_0 : Absorbance à 517 nm du standard (contient tous les éléments mais sans aucun échantillon).

A_1 : Absorbance à 517 nm de l'échantillon.

Pour notre extrait nous avons déterminé la valeur CE_{50} qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH [76].

Calcul de l'activité antiradicalaire :

Nous pouvons déduire l'activité anti-radicalaire de nos extraits en calculant l'inverse des valeurs des CE_{50} trouvées [77].

$$ARP = 1 / CE_{50}$$

ARP : Puissance anti-radicalaire

CE_{50} : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH

2- Protocol expérimental

2-1- Préparation de la solution DPPH

La solution de DPPH a été préparée à partir de 4mg de DPPH dissout dans 100 ml de méthanol absolu, une concentration de 0.004%.

2-2- Préparation de la solution de vitamine C

Cette solution préparée par dissolution de 50 mg de la vitamine C dans 10 ml de méthanol, puis sont fait des dilutions et l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

3-3- Préparation des échantillons

Au premier lieu, on prépare une solution à partir de la dissolution de 5 mg de l'extrait hydrométhnolique dans 1 ml de méthanol absolu. Cette solution dite solution mère, subit par la suite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de milligramme.

3-4- Protocol réalisé

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1 ml de la solution méthanolique de différentes concentrations et on lui ajoute 2 ml de la solution DPPH. Les tubes sont placés à l'obscurité, est à température ambiante (25°C) pendant 30 min. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique (vitamine C) dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

3-5- Détermination de la Concentration efficace médiane (CE₅₀)

Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante. Les CE₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et des standards.

4- Résultats de l'activité anti-oxydante testée par la méthode du DPPH :

L'activité antioxydante de l'extrait hydrométhanolique vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotomètre, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune pâle mesurable à 517 nm. Le virage vers cette coloration et l'intensité de cette coloration de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire.

La valeur de CE₅₀ représente la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres. L'évaluation de l'activité antioxydante de notre extrait a été faite par comparaison avec celle des antioxydants standards: l'acide ascorbique « Vitamine C ».

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 16, et illustrés par la figure 14.

Le tableau 16 représente les différentes concentrations, l'absorbance et le pourcentage d'inhibition de l'extrait hydrométhanolique de l'espèce *Origanum majorana* et du standard.

Tableau N°16 : Variation des absorbances et Pourcentages de réduction du radical libre DPPH● en fonction des différentes concentrations del'extrait hydrométhanolique et du standard.

	C(mg/ml)	0.1	0.125	0.25	0.5	1	2	3	5
Extrait hydrométhanolique	Absorbance	0.443	0.430	0.368	0.380	0.171	0.050	0.036	0.026
	% d'inhibition	18.5	20.9	23.2	30.14	68.56	90.7	93.2	94.8
Vit. C	Absorbance	0.6	0.669	0.584	0.113	0.052	0.051	0.043	0.027
	% d'inhibition	38.9	40.95	48.45	90.02	95.41	95.49	96.2	97.61

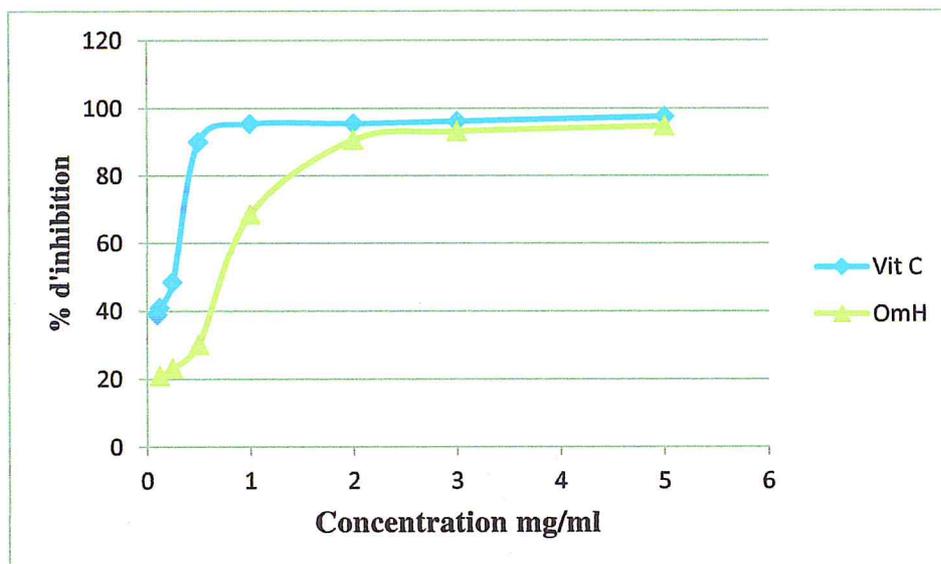


Figure 14 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'extrait hydrométhanolique et du standard.

L'interprétation des résultats de l'activité antioxydante de notre extrait par la méthode de DPPH• est exprimée en CE_{50} (Tableau 17).

Le CE_{50} de l'extrait hydrométhanolique est déterminée à partir du graphe (figure 14).

Un autre paramètre exprime le pouvoir anti-radicalaire, (noté : "ARP"), a été calculée à partir du premier.

Tableau N°17 : Valeurs CE_{50} et ARP de l'extrait hydrométhanolique de l'espèce *Origanum majorana* et du standard antioxydant.

Composés	Vit C	OmH
CE_{50} (mg/ml)	0.3	0.8
ARP	3.33	1.25

Ces résultats montrent que l'extrait hydrométhanolique de l'espèce *Origanum majorana* a un pouvoir antioxydant moyen, car il est nettement inférieur à celle de vitamine C.

III- Etude de l'activité antimicrobienne de l'*Origanum majorana*

1-Introduction

Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les microorganismes résistant aux antibiotiques. Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des microorganismes ou des plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles. En particulier, l'activité antimicrobienne d'huiles essentielles et des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, médicales et agro-alimentaires.

L'activité des huiles essentielles et des extraits aromatiques est souvent réduite à l'activité de leurs composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Evalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité des huiles de compositions semblables. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à l'intégrité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires.

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour de ces disques.

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'huile essentielle.

L'activité antimicrobienne varie selon le type d'extrait et le Gram des bactéries. Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux effets des extraits alcooliques. La résistance chez les bactéries à Gram négatif est attribuée à la présence d'une membrane externe imperméable aux composés lipophiles. L'absence de cette barrière chez les bactéries à Gram positif permet le contact direct des constituants hydrophobes des extraits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne [78].

2- Principe

La méthode consiste à déposer un disque en papier absorbant de 09 mm de diamètre imprégné de la substance à tester sur une boîte de géloseensemencée de culture microbienne à étudier.

Cette substance au cours de l'incubation diffuse sur la surface de la gélose à partir du disque et un gradient décroissant de concentration s'établit autour du disque donnant à la fin de l'incubation un halo clair autour du ce dernier ; c'est la zone d'inhibition

Le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en mm est proportionnel à l'efficacité de l'activité antimicrobienne de l'échantillon

3- Protocole expérimental

L'activité antimicrobienne biologique de l'huile essentielle et des extraits de l'*Origanum majorana* a été réalisé au niveau de laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.

Pour évaluer l'activité antimicrobienne d'HE et des extraits, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose. Les tests biologiques sont effectués sur 6 souches microbiennes pathogènes.

Une suspension de chaque germe est préparée en eau distillée stérile et ajustée à 10^8 bactéries/ml. Chaque suspension est étalée sur une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. Des disques stériles de 9 mm de diamètre sont ensuite déposés sur la gélose, ils sont imprégnés d'extraits ou d'huile essentielle.

Pendant l'incubation l'extrait ou l'huile essentielle va diffuser à partir du centre du disque. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre en (mm) de la zone claire autour du disque, appelée : zone d'inhibition (diamètre d'inhibition), cette dernière est le critère qui détermine la résistance ou la sensibilité de la bactérie vis-à-vis de la substance antibiotique [79].

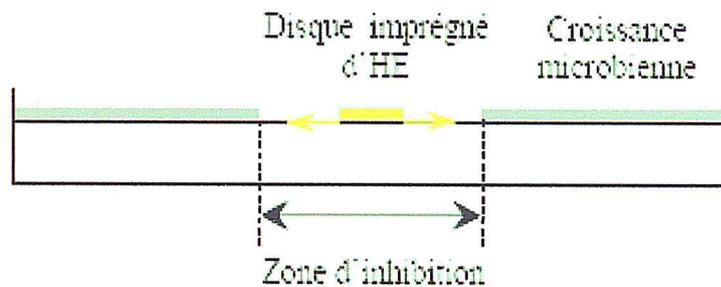


Figure 15: Aromatoگرامme sur boîte de pétri à diffusion à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle.

La sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens a été classifiée par le diamètre de la zone d'inhibition représenté dans le tableau suivant :

Tableau N°18 : Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches [80].

Diamètre	Sensibilité
$D > 23\text{mm}$	Extrêmement sensible
$18\text{mm} < D < 23\text{mm}$	Sensible
$12\text{ mm} < D < 17\text{mm}$	Intermédiairement
$D < 11\text{mm}$	Non sensible (résistante)

La sensibilité des souches microbiennes a été testée vis-à-vis d'un antibiotique [Ciprofloxacine (ATB) ; 0.1mg/disque] et deux antifongiques [Métronidazol (ATF 1) ; 0.25mg/disque, et Amphotéricine B (ATF 2) ; 0.5mg/disque] selon la méthode de diffusion en milieu solide.

La ciprofloxacine est une fluoroquinolone, qui possède un vaste spectre d'activités contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

a- Les souches microbiennes

Quatre souches bactériennes ont été testés : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785 (Bactéries gram négatif). *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Bactéries gram positive). Et deux souches fongiques : une levure ; *Candida albicans* ATCC 10231 et un champignon ; *Aspergillus Braziliensis*.

b- Préparation des milieux de culture

Dans un bain Marie infuser les milieux gélosée : Mueller Hinton (MH) pour les bactéries et Sabouraud (SAB) pour les levures et les champignons.

Couler les milieux dans des boites de pétri de 90 mm avec une profondeur de 3 à 4 mm.

Sécher les boites avant utilisation pendant 30 mn à 32°C.

c- Préparation de l'inoculum

Les suspensions bactériennes ont été réalisées par prélèvements de 3 à 4 colonies isolées d'une culture pure de 18h pour les bactéries et 48h pour les levures.

L'isolement se fait à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, en raclant 2 à 3 colonies bien isolés et identiques à partir d'une culture pure de 24 heures d'incubation sur milieu d'isolement.

- Déchargé les suspensions bactériennes dans 05 ml d'eau physiologique stérile.
- Il faut noter que l'inoculum bactérie peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort, et il doit êtreensemencé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

d- Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne déjà préparée.
- L'essorer en le passant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosé, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boite 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. A la fin de l'ensemencement on passe l'écouvillon sur le périphérique de la boite de Pétri.
- Il faut recharger l'écouvillon à chaque fois, dans le cas où l'on ensemence plusieurs boites.

3- Résultats et discussion

Les extraits (Chloroformique et hydrométhanolique) ont été solubilisés dans le DMSO pour obtenir des concentrations de 40 mg/ml.

L'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana* a été testé pur sans dilution.

Après 24 heures d'incubation à 37°C pour les souches bactériennes et 48 heures à 26°C pour les souches fongiques, les zones d'inhibition des différents extraits et d'HE ont été mesurées. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau N°19 : les diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits, d'HE, de l'ATB et des ATFs relatives aux différentes souches microbiennes

	Cp	Mr	ApB	HE	OmC	OmH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42	-	-	28	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	36	-	-	12	14	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	-	-	21	0	0
<i>Escherichia coli</i>	34	-	-	13	4	9
<i>Candida albicans</i>	-	0	16	58	0	0
<i>Aspergillus Braziliensis</i>	-	13	17	51	0	0

[Ciprofloxacine =Cp, Métronidazol=Mr, Amphotéricine B =Ap B]

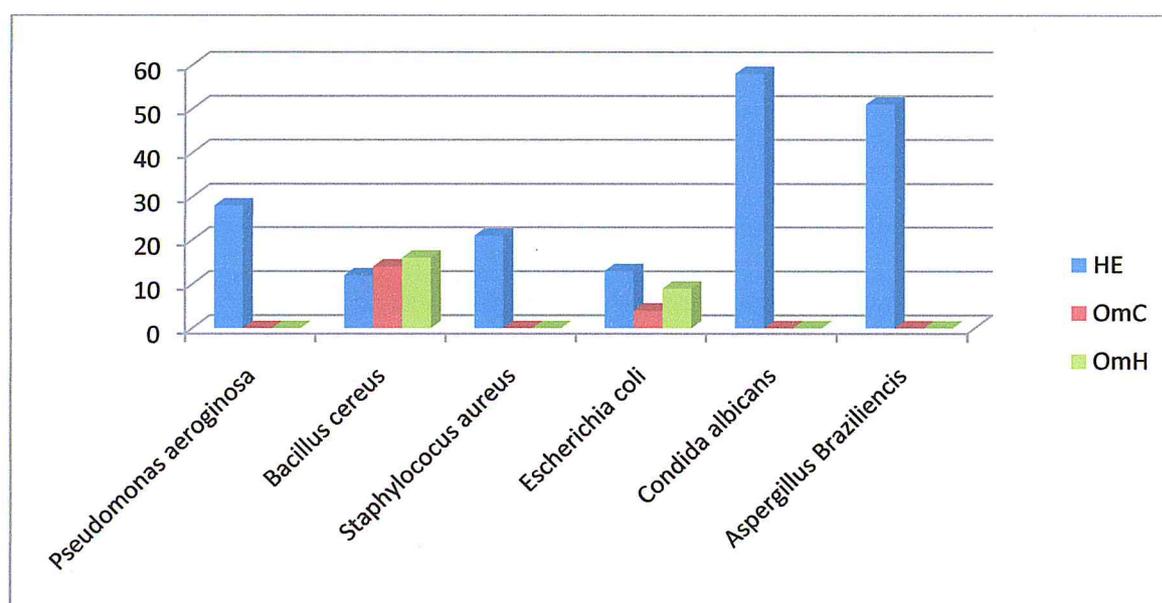


Figure 16 : les diamètres des zones d'inhibition des extraits et d'HE relatives aux différentes souches microbiennes.

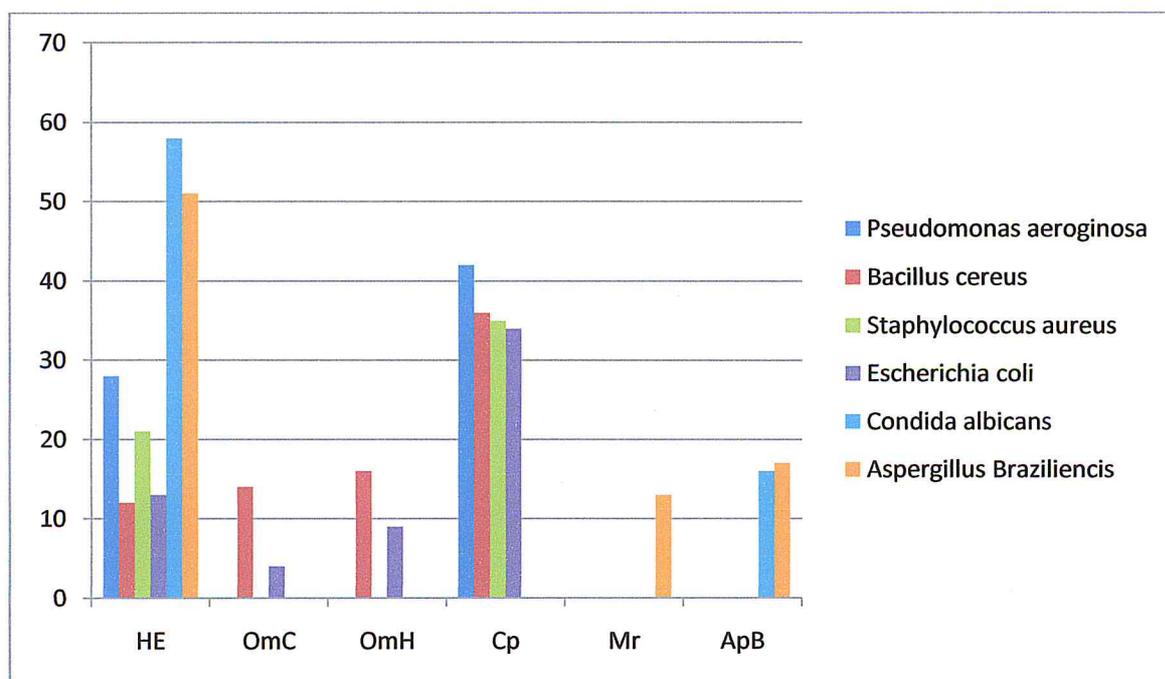


Figure 17: Les diamètres des zones d'inhibition des extraits, HE, Cp, Mr et ApB relatives aux différentes souches microbiennes.

La méthode de disque a permis de déterminer l'action d'HE et des extraits de la plante (dissouts dans le DMSO) sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone.

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana* donne des zones d'inhibition très importantes 12 à 28 mm avec toutes les souches bactériennes quand à testées.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* se révèle la plus résistante pour l'HE. La souche *Staphylococcus aureus* est plus résistante que les souches d'*Escherichia coli* et *Bacillus cereus*, une résistance est observée avec les souches bactérienne : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* qui n'ont aucune sensibilité vis-à-vis tous les extraits (hydrométhanolique et chloroformique) et aucune zone d'inhibition n'est observée.

Les résultats obtenus pour les souches antifongiques testées ont montré que les souches *Candida albicans* et *Aspergillus Braziliensis* sont extrêmement sensibles pour l'HE de l'espèce *Origanum majorana* avec des zones d'inhibition de 58 mm et 51 mm,

respectivement. par contre, elles ont montré une résistance vis-à-vis les extraits, absence totale de zone d'inhibition.

- **En conclusion**, l'HE a réagit positivement sur toute les souches microbiennes testées ce qui confirme que la HE de la plante *Origanum majorana* est douée de propriétés antimicrobiennes.

Par contre, les extrait hydrométhanolique et chloroformique de l'espèce *Origanum majorana* montré une activité antimicrobienne intermédiairement vis-à-vis les souches *Bacillus cereus* et *Escherichia colie*, et une résistance vis-à-vis les autres souches.

Conclusion générale

Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique et biologique de l'espèce *Origanum majorana*, plante médicinale et aromatique de la famille des Lamiaceae, endémiques de l'Ouest de l'Algérie (récoltée à Khemis Miliana). Cette plante est utilisée dans la pharmacopée traditionnelle Algérienne pour le traitement des infections de l'appareil respiratoire, et administrée exclusivement par voie orale.

En premier lieu, nous avons procédé à l'extraction des métabolites secondaires en utilisant des solvants de polarités différentes. Cette opération a conduit à l'obtention de trois extraits (chloroformique, hydrométhanolique et éthanolique) avec de bons rendements.

- L'extraction de l'huile essentielle à partir de la plante sèche et fraîche par hydrodistillation dans un Clevenger nous a permis d'obtenir un rendement de 1.1% et 0.38% respectivement.

- L'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana* fraîche a montré la présence de plus de 36 Composés dont les majoritaires sont : 1-Chlorométhyl-1-(3,5-diméthylcyclohexyloxy)-1-silacyclohexane (15.29%), de l'Estragol (9.95%).

- Le fractionnement de l'extrait éthanolique de l'espèce *Origanum majorana* sur une colonne de gel de silice, nous a permis d'isoler un composé pur, qui est en cours d'identification.

- l'évaluation du contenu des composés phénoliques de l'extrait hydrométhanolique, en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé la présence de ces composés avec une teneur de 24mg EAG/ g d'extrait.

- L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH de l'extrait hydrométhanolique a montré que cet extrait possède un pouvoir antioxydant important.

- Les résultats des tests de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'espèce étudiée avec les souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* ont montré que cette huile essentielle agit de façon active sur toutes les bactéries testées. D'autre part, L'HE a révélé une sensibilité très puissante et

importante vis-à-vis les souches fongiques : *Aspergillus Braziliensis* et *Condida albicans* avec une zone d'inhibition de 51 mm et de 58 mm respectivement.

- De façon général, les autres extraits étudiés (chloroformique, et hydrométhanolique) ont révélé une activité antibactérienne considérablement importante vis-à-vis les souches testés à l'exception de la souche *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

- Concernant l'activité antifongique des extraits (chloroformique, et hydrométhanolique), les résultats obtenus ont montré que les souches *Candida albicans* et *Aspergillus braziliensens* ne présentent aucune sensibilité vis-à-vis ces extraits.

Pour conclure, cette étude a montré que l'espèce *Origanum majorana* est riche en métabolites secondaires spécialement les composés phénoliques, une exploitation de leurs propriétés antioxydante et antimicrobienne implique une recherché plus poussée de ses principes actifs.

Références bibliographiques

- [1] Medi M., 2010. L'étude de l'influence des paramètres intrinsèque et extrinsèques sur le rendement et la composition d'HE de thymus vulgaris ». Memoir de magister (YAHYAOUI .S).
- [2] Chikhoune A., 2007. Les huiles essentielles d'espèces de thym et d'origan. Mémoire de magister, INA. Alger, pp.118.
- [3] Lee S.J., Umamo K., Shibamoto T., Lee K., 2005. G-identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties-food chemistry, vol. 91; pp.13-137.
- [4] Marzouk Z., Neffati A., Marzouk B., Chraief I., Khemiss F., Chekir Ghedira L., Boukef K., 2006. Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of tunisian *Rosmarinus officinalis* L. Oil from kasrine- Journal of food Agriculture et Environment; vol. 4; N° 3-4; pp.61-65
- [5] Rota M.C., Herrera A., Martinez R.M., Sotomayer J.A., Jordan M.J., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis*, essential oils- Food control; vol.19; pp.681-687.
- [6] Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadi M.S., Ghorbani A., 2005. Labiatae Family in Folk Medicine in Iran: From Ethnobotany to Pharmacology- Iranian Journal of Pharmaceutical Research; vol.2; pp.69-79.
- [7] Jetswaart J.H.A., 1980. Taxonomic Revision of the genus *Origanum* (Labiatae), Leiden Botanical Series, Vol 4, Leiden University Press, The Hague, Netherlands.
- [8] Baser K.H.C., 1995. Essential oils from aromatic plants which are used as herbal tea in Turkey. Actes de la 13ème Conférence internationale sur les saveurs, les parfums et les huiles essentielles tenue à Istanbul, Turquie, pp.200-201.

[9]Greuter W., Burdet H. M., Long G., 1986. Med Checklist. In Editions du Conservatoire de Jardin Botaniques de la ville de Genève, Vol 3.

[10]Kokkini S., 1996. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In Padulosi S. [Ed.], Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano. CIHEAM Publication 12, Bari, Italy, pp.389.

[11]Bellekhdar J., 1997. Pharmacopée marocaine traditionnelle : Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Paris, Edit. Ibis Press, pp.764.

[12] Bouhdid S., Abrini J., Zhiri A., Espuny M.J., Manresa A., 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *J. Appl. Microbiol.*;106(5): pp.1558-1568.

[13] El Babili F., Bouajila J., Souchard J.P., Bertrand C., Bellvert F., Fouraste I., Moulis C., Valentin A., 2011. Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. *J. Food Sci.* 76(3): pp.512-518.

[14] Traboulsi A.F., Taoubi K., El-Haj S., Bessiere J.M., Rammal S., 2002. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* 58, pp. 491–495.

[15] Oka Y., Nacar S., Putievsky E., Ravid R., Yaniv Z., Spiegel Y., 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology* 90, pp. 710–715.

[16] Goun E., Cunningham G., Solodnikov S., Krasnykch O., Miles H., 2002. Antithrombin activity of some constituents from *Origanum vulgare*. *Fitoterapia*, 73, pp. 692–694.

[17] Abdelmalek E., Dalila B., Abdelkader D., Hassane G., El Houssaine H., Abdellah F., Abdeslam E., 2008. *Plantes Medicinales Et Aromatiques Marocaines : Opportunités Et Défis*, Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques, Mezraoua-Taounate, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès, Maroc.

[18] Geeta T., Shishir T., 2015. Chemical, biocidal and pharmacological aspects of *Origanum* species: A brief review, *Journal- Indian Chemical Society*.

[19] Bruneton J., 2009. *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. Tech. Et Doc(eds), Lavoisier, Paris: pp.273-277, pp.366-377, pp.502-506.

[20] Bouakaz I., 2006. *Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala**, Mémoire de master, Batna.

[21] Marfak A., 2003. *Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides*, thèse de doctorat, Limoges.

[22] Bohm A.B., 1988. The minor flavonoids. In J.B. Harborne (ed.), *The flavonoids. Advances in Research since 1980*, Chapman and Hall, New York, pp.352.

[23] Harvala C., Skaltsa H., 1986. Contribution à l'étude chimique d'*Origanum dictamnus* L. 1re communication. *Plantes médicinales et phytothérapie* Tome XX(4), pp. 300–304.

[24] Souleles C., 1990. Sur les flavonoïdes d'*Origanum dubium*. *Plantes médicinales et phytothérapie*, Tome XXIV, 3, pp.175–178.

[25] Saxena M., Saxena J., & Pradhan A., 2012. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 16, pp.130–134.

[26] Wu X. J., Song J. X., Zhao A. H., & JIA W., 2011. Phenolic acid constituents from *Dracocephalum moldavica*. *Natural Product Research and Development*, 23, pp.446–448.

- [27] Bruneton J., 1993. *Eléments de phytochimie et de pharmacologie*. 2^{ème} Ed. Lavoisier, Paris, pp.405-426.
- [28] Richter G., 1993. « *Métabolisme des végétaux* » *Physiologie et biochimie*, Presses polytechniques et universitaires. Romandes, pp.292.
- [29] Balz R., 1986. *Les huiles essentielles et comment les utiliser*. Ed. Rodolphe BALZ, pp.152.
- [30] Skoula M., Gotsiou P., Naxakis G., Johnson C. B., 1999. Achemosystematic investigation on the mono and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae), *Phytochemistry*, 52, pp.649-657.
- [31] Harvala C., Menounos P., Argyriandou N., 1986. Essential oil from *Origanum dictamnus*, *Progress in Essential Oil Research*, pp. 107-108.
- [32] Tumen G., Baser k. H.C., Kirimer N., Ozek T., 1995. Essential oil of *Origanum saccatum* P. H. DAVIS., *J. Essent. Oil Res.*, 7, pp.175-176.
- [33] Tumen G., Ermin N., Ozek T., Baser k .H.C., 1994. Essential oil of *Origanum solymicum* P. H. Davis, *J. Essent. Oil Res.*, 6, pp.503-504.
- [34] Arnold N., Bellomeria B., Valentini G., 2000. Composition of the essential oil of three different species of *Origanum* in the Eastern Mediterranean, *J. Essent. Oil Res.*, 12, pp.192-196.
- [35] Baser k. H.C., Ermin N., Kirkcuoglu M., Tumen G., 1994. Essential oil of *Origanum hypericifolium* O. Schwarz et P. H. Davis, *J. Essent. Oil Res.*, 6, pp.631-633.
- [36] Baser K.H.C., Tumen G., Duman H., 1997. Essential oil of *Origanum acutidens* (Hand.Mazz.) Ietswaart, *J. Essent. Oil Res.*, 9, pp.91-92.
- [37] Baser K.H.C., Duman H., 1998. Composition of the essential oils of *Origanum boissieri* Ietswaart and *O. bargyli* Mouterde, *J. Essent. Oil Res.*, 10, pp. 71-72.

[38] Baser K.H.C., Ermin N., Ozek T., Demircakmak B., Tumen G., Dumen H., 1996. Essential oil of *Thymus asintensis* Bornm. et Azev. subsp. *Isaurica* P. H. Davis and *Origanum leptocladum* Boiss., J. Essent. Oil Res., 8, pp. 675

[39] Baser K.H.C., Ozek T., Tumen G., 1995. Essential oil of *Origanum rotundifolium* Boiss., J. Essent. Oil Res., 7, pp. 95-96.

[40] Gotsiou P., Naxakis G., Skoula M., 2001. Diversity in the composition of monoterpenoids of *Origanum microphyllum*, Biochemical Systematics and Ecology, pp. 865-879.

[41] Baser K.H.C., Ozek T., Tumen G., Sezik E., 1993. Composition of the essential oils of Turkish *Origanum* species with commercial importance, J. Essent. Oil Res., 5, pp. 619-623.

[42] Souleles C., 1991. Volatile constituents of *Origanum dubium* leaves and stem bark, Planta Med., 57, pp. 77-78.

[43] Ruberto G., Biondi D., Meli R., Piarell I., 1993. Volatile flavour components of Sicilian *Origanum onites* L., Flavour Fragr. J., 8, pp. 197-200.

[44] Fleisher A., Fleisher Z., 1991. Chemical composition of *Origanum syriacum* L. Essential oil, J. Essent. Oil Res., 3, pp. 121-123.

[45] Dudai N., Larkov O., Chaimovitsh D., Lewinsohn E., Freiman L., Ravid U., 2003. Essential oil compounds of *Origanum dayi* Post, Flavour Fragr. J., 18, pp. 334-337.

[46] Danin A., Ravid U., Umamo K., Shibamoto T., 1997. Essential oil of *Origanum ramonense* DANIN leaves from Israel, J. Essent. Oil Res., 9, pp. 411-417.

[47] Sammoudi R., 2002. Étude comparative de la composition chimique de l'huile essentielle de trois provenances de *Origanum grosii* dans le rif occidental, DESA, Université Abdelmalek Essaadi, Faculté des sciences, TETOUAN.

[48] Kokkint S., Karousou R., Hanlidou E., 2004. Essential Oil Composition of Greek (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and Turkish (*O. onites*) Oregano : a Tool for Their Distinction., J. Essent. Oil Res., 16, pp. 334-338.

[49] Mockute D., Bernotiene G., Judzentiene A., 2001. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius (Lithuania), Phytochemistry, 57, pp. 65- 69.

[50] Chalchat J.C., Pasquier B., 1999. Chemical studies of *Origanum vulgare* L. ssp. *gracile* (Koch) Ietswaart and *Origanum vulgare* L. ssp. *virens* (Hoffm. and Link) Ietswaart, J. Essent. Oil Res., 11, pp. 143-144.

[51] Jeannot V., 2003. *Origanum compactum* BENTHAM: Composition of the Hydrolat Aromatic Fraction, Comparaison with the Essential Oil and its Interest in Aromatherapy, The International Journal of Aromatherapy, 13, pp. 90-94.

[52] Baser K.H.C., Ozek T., KIRKCUOGLU M., Tumen G., 1996. Essential oil of *Origanum laevigatum* Boiss., J. Essent. Oil Res., 8, pp. 185-186.

[53] Bosabalidis A. M., Skoula M., 1998. A comparative study of the glandular trichomes on the upper and lower leaf surfaces of *Origanum x intercedens* Rech., J. Essent. Oil Res., 10, pp. 277-286.

[54] Kerbouche L., Hazzit M., Baaliouamer A., Miguel M., 2015. Biological Activities of Essential Oils and Ethanol Extracts of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. and *Origanum floribundum* Munby, Journal of Essential Oil Bearing Plants.

[55] Vera R.R., Chane-Ming J., 1999. Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. Food Chemistry 66.

[56] Chadeaud M., Emberger L., 1960. *Traité de botanique systématique, Les végétaux vasculaires, Tome II*, Ed. Masson et Cie pp. 832-833.

[57] Furia T. E., Bellanca N., 1971. *Fenaroli's handbook of flavoring ingredients*, The Chemical Rubber Co., Cleveland, OH.

[58] Williams D. G., 1997. *The Chemistry of Essential Oils*. Micelle Press. England.

[59] Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.

[60] Kim J., Marshall M.R., Wei C, 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43.

[61] Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H., 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry.* 53, 7749–7759.

[62] Dorman H.J.D., Peltoketo A., Hiltunen R., Tikkanen M.J., 2003. Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem.* 83, 255–262.

[63] Yousfi M., 2015. GC/MS Analysis of Essential Oils of *Cymbopogon schoenanthus* and *Origanum majorana* L. Grown in Eastern Algeria, *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 27, N°10.

[64] Hilan C., Sfeir R., Aitour S., 2011. Chimiotypes De Plantes Communes Auliban Du Genre *Origanum* Et Du Genre *Micromeria* (Lamiaceae). *Lebanese Science Journal*, Vol. 12, No. 1.

[65] El-Akhal F., El Ouali Lalami A., Ez Zoubi Y., Greche H., Guemmouh R., 2014. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Origanum majorana* (Lamiaceae) cultivated in Morocco against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.

[66] Jeovandro., Ricardo A., Lucas U., Willian F., 2013. Photodegradation Of Essential Oil From marjoram (*Origanum majorana* L.) Studied By GC-MS and UV-VIS Spectroscopy.

[67] 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 JEOP.

[68] Bandyukova V. A., Shinkareako A. L., 1973. The thin layer chromatography of flavonoids. Chemistry of natural compounds., 9 (1) : pp.17-21.

[69] Lahouel M., 2005. Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.

[70] Markham K. R., 1982. Techniques of flavonoids identification. Ed Academic Press. pp.6-10.

[71] Bouguerra K., 2012. L'étude de l'influence des paramètres intrinsèque et extrinsèques sur le rendement et la composition d'HE de thymus et d'origan. Mémoire de magister (YAHYA OUI .S).

[72] Portes E., 2008. Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. Thèse de doctorat Université Bordeaux I. pp.44-46.

[73] Maamri S., 2008. Etude de *pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Mémoire de Magister Université de BOUMERDES. pp. 10 11 12 35 57.

[74] HUANG D., PRIOR L., 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, Agricultural & Food Chemistry, 53, pp.1841-1856.

[75] Siddhuraju P., Becker K., 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51, pp.2144– 2155.

[76] Samarth R.M., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A., 2008. Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract, *Food Chemistry*, 106, pp.868-873.

[77] Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igic R., 2008. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 111, pp.925–929.

[78] Wendakoon C.N, Sakaguchi M., 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices, *Journal of Food Products*, 58, pp. 280-283.

[79] Viuda-Martos M., Yolanda R.N., Sánchez Z., Fernández-López F., José A., 2010. Antibacterial activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet, *Flavour Fragrance Journal*, 25, pp.13–19.

[80] Ernst E., Pittler M.H., 2005. *Médecines alternatives: le guide critique*, Ed. Elsevier Masson, pp. 36.

Annexe

1- Le filtrat d'extraits de l'espèce *Origanum majorana*

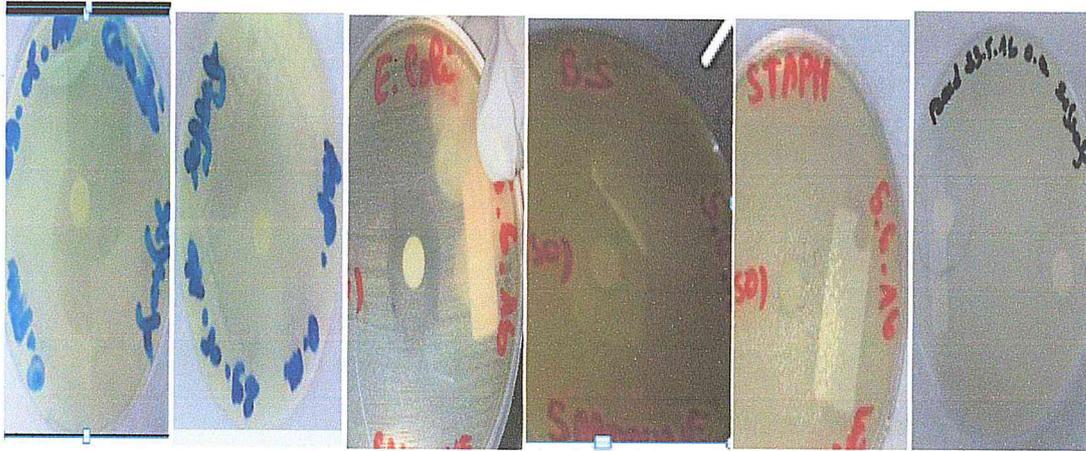


2- chromatographie sur colonne et les fractions de l'extrait éthanolique de l'espèce *Origanum majorana*

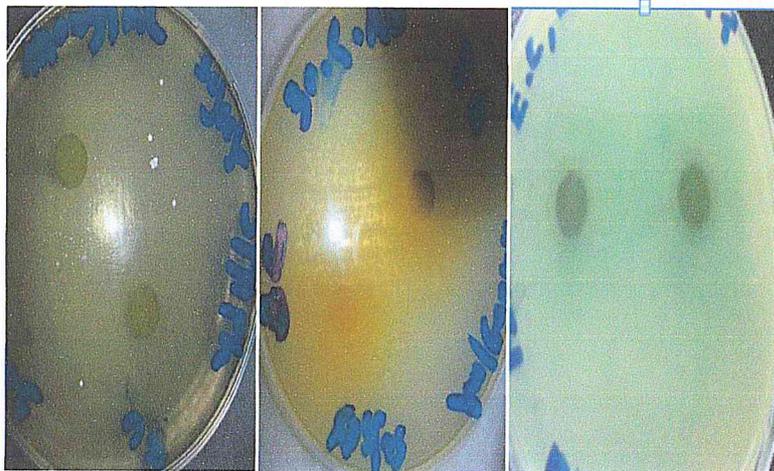


Les résultats de l'activité antimicrobienne :

1- HE



2- OmC



3- OmH

