

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

Université Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et la Vie
Département de Biologie des Populations et Organismes

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme de
Master en Science de la Nature et de la Vie
Option : Phytothérapie et Santé

THEME

Evaluation de quelques activités biologiques de
l'huile essentielle de l'Origan (*Origanum
floribundum* Munby.)

Présenté par
Rebaâ Hakima

Date de Soutenance
Mardi 10/10/2017

Devant le jury composé de :

Mme Touabia M.	MAA	Université Blida 1	Présidente
Mme Kebbas S.	MCB	Université Blida 1	Examinatrice
Mme Benassel N.	MAA	Université Blida 1	Promotrice

☞ Promotion : 2016-2017 ☞

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents:

Ma mère Fatiha, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père Abdelkader, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privation pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Ma Grande mère Aida et mon grand père Massoud "Rabi yarhamhom".

Ma Grande mère Meriem et mon Grand père Mohamed.

Mes chers frères Ahmed, Mohamed et sa femme Ghania, Khaled et sa fiancée Fatima.

Mes chères sœurs Amina, Hadil et Khadija et son épou Rabeh et sa fille Yakoute.

Mon fiancé Ali et toute sa famille.

Ma belle-mère, mon bon père et ma belle-sœur Zahra.

Mes oncles et leurs épouses et mes tantes et leurs époux.

Mes cousins et mes cousines.

A ma chère amie Razika.

Et à tous les membres de notre promo.

Hakima

Remerciements

*Nous remercions avant tout **ALLAH**- le tout puissant- qui nous a donné la santé, la patience et la volonté pour réaliser ce travail et de nous avoir guidées durant toute notre formation.*

Merci à nos proches notamment nos parents, merci pour votre soutien moral et votre amour...

Nous remercions Madame Touabia de nous avoir honoré de présider le jury de soutenance.

Nous remercions Madame Kebbas., qui a bien voulu examiner ce manuscrit.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et notre vive connaissance à Mme Benassel, enseignante à la faculté de science de nature et de la vie, Université de Blida 1 pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'a accordé pour réaliser ce travail.

Nous remercions vivement l'équipe du groupe pharmaceutique Biotique de SAIDAL pour leur orientation et leur disponibilité.

*Nous tenons à remercier chaleureusement Mr. **Salim**, chef de département de laboratoire de physico-chimie pour son soutien, sa disponibilité et sa gentillesse, pour effectuer une bonne partie de ce travail et plus spécialement Mme **Fatiha** et Mme **Souad** qu'elles m'ont aidées beaucoup durant notre stage.*

*Nous remercions aussi à Mme **Mimi** qui nous a accueillies au sein de son laboratoire de toxicologie, ainsi que toute son équipe. Nous la remercions vivement pour sa collaboration. Nous tenons à remercier l'ensemble du personnel de groupe de SAIDAL, pour leur convivialité pour leurs disponibilités*

*Nous tenons à remercier Mme **Selma**, Mr. **Djamel** ainsi que l'ensemble du personnel du Laboratoire d'Hygiène de Feroudja à Blida, pour leur convivialité, et disponibilité.*

Nous tenons à remercier le responsable ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire de phytopharmacie de la faculté d'Agronomie, Université de Blida 1, pour leur convivialité, et disponibilité.

Nous tenons particulièrement à exprimer notre gratitude à tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué de ce travail et tous ceux qui ont souhaité nous avoir arriver à ce stade.

Chapitre 1

Données bibliographiques

Chapitre 2

Matériel et méthodes

Chapitre 3

Résultats et discussion

Conclusion

Annexe

Sommaire

Résumé	
Abstract	
Liste de tableaux	
Liste de figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Chapitre 1 : données bibliographiques	
1. Les huiles essentielles	2
1.1. Historique et origine des huiles essentielles.....	2
1.2. Définition.....	3
1.3. Répartition et localisation des huiles essentielles.....	3
1.4. Fonction des huiles essentielles.....	4
1.5. Propriétés physiques.....	4
1.6. Composition chimique.....	5
1.7. Action des huiles essentielles.....	7
1.8. Classification des huiles essentielles.....	8
1.9. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	8
1.10. Toxicité des huiles essentielles.....	10
1.11. Conservation des huiles essentielles.....	11
2. Caractères généraux de la famille des lamiaceae	11
3. Généralités sur l'Origan : <i>Origanum floribundum</i>	12
3.1.1. Historique.....	12
3.1.2. Etymologie.....	12

3.1.3. Nom commun.....	12
3.1.4. Systématique.....	13
3.1.5. Description de la plante étudiée.....	14
3.1.6. Propriétés médicinales.....	15
3.1.7. Cycle biologique.....	16
3.1.8. Ecologie.....	16
3.1.9. Répartition géographique.....	17
4. L’huile essentielle de l’Origan.....	18
4.1. Composition chimique.....	18
4.2. Usage de l’huile essentielle de l’Origan.....	18
 Chapitre 2 : matériel et méthodes	
1. Lieu de stage.....	20
2. Matériel utilisé.....	20
1. Matériels biologiques.....	20
2. Matériels non biologiques.....	21
3. Méthodes.....	22
1. Extraction de l’huile essentielle de l’Origan.....	22
2. Calcul du rendement en huile essentielle.....	24
3. Détermination du taux d’humidité.....	25
4. Caractérisation de l’huile essentielle de l’Origan.....	25
5. Screening phytochimique.....	30
6. Evaluation des activités biologiques.....	32

3.6.1. Activité antioxydante.....	32
3.6.2. Activité anti-inflammatoire.....	33
3.6.3. Activité antimicrobienne.....	37

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Rendement en huile essentielle de l'Origan	40
2. Caractères organoleptiques.....	40
3. Résultats des indices physicochimiques.....	41
4. Résultats de l'étude phytochimiques.....	42
5. Résultats de taux d'humidité.....	43
6. Résultats de l'activité antioxydante.....	44
7. Résultats de l'activité anti-inflammatoire.....	46
8. Résultats de l'activité antimicrobienne.....	47
Conclusion.....	57
Références bibliographiques.....	58

Annexes

Listes des tableaux

Tableau 1 : les souches microbiennes testées.....	21
Tableau 2 : rendement en huile essentielle.....	40
Tableau 3 : caractères organoleptiques de l'huile essentielle de l' <i>Origanum floribundum</i>	40
Tableau 4 : valeurs des indices physicochimiques de l'HE de l' <i>Origanum floribundum</i>	41
Tableau 5 : résultats du screening phytochimique d' <i>Origanum floribundum</i>	43
Tableau 6 : pourcentage de l'activité anti-radicalaire de l'HE et de la Vit C.....	44
Tableau 7 : pourcentage d'augmentation et de réduction de l'œdème.....	46
Tableau 8 : résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE de l'Origan.....	48
Tableau 9 : appareillage, verreries, réactifs et solutions.....	65
Tableau 10 : Evolution moyenne de poids des pattes postérieures, gauches et droite des souris de chaque lot, après injection de la carraghénine.....	71

Liste des figures

Figure 1 : aspect morphologique de l' <i>Origanum floribundum</i> (Original, 2017).....	15
Figure 2 : Dispositif de l'hydro-distillation de type clevenger (original, 2017).....	23
Figure 3 : processus de décantation et récupération des HE (original,2017).....	24
Figure 4 : Echantillon de l'HE (original, 2017).....	24
Figure 5 : La répartition des 4 lots des souris (originale, 2017)	34
Figure 6 : gavage des souris par les différentes solutions (originale, 2017)	35
Figure 7 : Injection de la carraghénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure de la souris. (Originale, 2017).....	36
Figure 8 : la coupe des pattes postérieures droites et gauches des souris (originale, 2017).....	36
Figure 9 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'HE d'Origan et le standard (l'acide ascorbique).....	45
Figure 10 : pourcentage d'augmentation et de réduction de l'œdème provoqué par la carraghénine.....	46
Figure 11 : résultats de l'activité antibactérienne par la méthode Aromatogramme.....	51
Figure 12 : Résultats de l'activité antifongique par la méthode aromatogramme.....	52
Figure 13 : pouvoir antibactérien de la phase vapeur de l'HE de l' <i>Origanum floribundum</i> sur les bactéries Gram-.....	54
Figure 14 : pouvoir abtibactérien de la phase vapeur de l'HE de l' <i>Origanum floribundum</i> sur les bactéries Gram+.....	55
Figure 15 : pouvoir antifongique de la phase vapeur de l'HE de l' <i>Origanum floribundum</i>	56
Figure 16 : Echantillon du l'Herbier de l'ENSA.....	66
Figure 17 : la plante de l'Origan sèche (Originale, 2017).....	66

Figure 18 : préparation de l'extrait aqueux « infusé » (Original, 2017).....	66
Figure 19 : identification de quelques composés chimiques (Original, 2017).....	67
Figure 20 : Polarimètre de l'intérieur et de l'extérieur (Original, 2017).....	68
Figure 21 : réfractomètre (Original, 2017).....	68
Figure 22 : dispositif de l'indice de saponification (Original, 2017).....	68
Figure 23 : vortex (Original, 2017).....	69
Figure 24 : Agitateur (Original, 2017).....	69
Figure 25 : Etuve de paillasse (Original, 2017).....	69
Figure 26 : balance analytique (Originale, 2017)	69
Figure 27 : Dessiccateur (Original, 2017).....	69
Figure 28 : spectromètre (Original, 2017).....	70
Figure 29 : les deux cuvettes de spectromètre (Original, 2017).....	70
Figure 30 : résultats de l'activité antioxydante (Original, 2017).....	70
Figure 31 : la solution de DPPH* (Original, 2017).....	70
Figure 32 : les pattes des souris (Original, 2017).....	72
Figure 33 : les solutions administrées aux souris (Original, 2017).....	72
Figure 34 : Etuve de stérilisation (Original, 2017).....	73
Figure 35 : Etuve d'incubation (Original, 2017).....	73
Figure 36 : Les suspensions bactériennes (Original, 2017).....	73
Figure 37 : les suspensions fongiques (Original, 2017).....	73
Figure 38 : Les antibiotiques de référence (Original,2017).....	74
Figure 39 : les antibiotiques préparés en solutions (Original, 2017).....	74

Listes des abréviations

PM : plantes médicinales

HE : Huile essentielles

DPPH : 2,2- diphényl-1-picrilhydrazil

AFNOR : Association Française de Normalisation.

OMS : organisation mondiale de la santé

APG : Angiosperm Phylogeny Group III.

ENSA : Ecole national supérieur de l'agronomie

IA : Indice d'acide

IR : Indice de réfraction

IS : Indice de saponification

IE : Indice d'ester

FeCl₃ : Trichlorure de Fer anhydrique.

H₂SO₄ : Acide Sulfurique.

Mg : Magnésium.

NaCl : chlorure de sodium.

NaOH : acétate de sodium.

HCL : Acide chlorhydrique

GEN : Gentamycine

FLC : Fluconazol

Résumé

Notre étude porte sur l'extraction d'huile essentielle de l'Origan « *Origanum floribundum* », et l'analyse de ses caractéristiques et ses activités antioxydante, anti-inflammatoire et antimicrobienne.

Le screening phytochimique réalisé sur la poudre et l'infusé de l'Origan (*Origanum floribundum*), révèle la présence de plusieurs métabolites secondaires tels que : les glucosides, des tanins, les flavonoides, les alcaloides, les saponosides, les anthocyanes.

Les résultats de l'analyse physico-chimique montrent que l'huile essentielle présente un indice de réfraction égale à 1,5, un indice d'acide égale à 1,12, un indice de saponification égale à 308,55, un indice d'ester d'une valeur égale à 307,43.

L'étude de l'activité antioxydante a révélé que l'huile essentielle de l'Origan possède un bon pouvoir antioxydant par rapport à celui de l'acide ascorbique.

En outre, l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de l'Origan évaluée par deux méthodes, Aromatogramme et micro-atmosphère a révélé que l'huile essentielle est très active contre les souches bactériennes *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, et les souches fongiques *Aspergillus braziliensis*, *Aspergillus flavus*, et *Candida albicans*.

L'effet anti-inflammatoire a révélé que l'huile essentielle réduit de façon importante l'œdème de la patte de la souris induit par la caraghénine à 1%.

Mots clés : *Origanum floribundum*, huile essentielle, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, activité antimicrobienne.

Abstract

Our study focuses on the extraction of essential oil from the Origan plant « *Origanum floribundum* », its characteristics and analysis of the antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities.

The phytochemical test carried out on the powder and the infusion of *Origanum floribundum* reveal the presence of several secondary metabolites such as : glucosides, tannins, flavonoides, alkaloids, saponosides and anthocyanins.

The results of the physico-chemical analysis show that the essential oil has a refractive index equal to 1,5 ; an acid number equal to 1,12 ; a saponification index equal to 308,55 and an ester index of a value equal to 307,43.

The study of the antioxidant activity revealed that the essential oil of the Oregano has a good antioxidant capacity compared to the control ascorbic acid .

The study of the antimicrobial activity of the essential oil against evaluated by two methods (Aromatogram and Micro-atmosphere) revealed of all the strains tested with a forte activity for the bacterial strains *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, and the fungal strains *Aspergillus braziliensis*, *Aspergillus flavus*, and *Candida albicans*.

The anti-inflammatory effect revealed that the essential oil significantly reduced the edema of the mouse leg induced by caraghenin at 1 %.

Keyword : *Origanum floribundum*, essential oil, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, antimicrobial activity.

الملخص

تركزت دراستنا على استخراج الزيت الأساسية لنبات الزعتر وتحليل وظائفها المضادة للاكسدة والالتهابات والجراثيم.

اظهر اجراء الاختبار الكيميائي النباتي على مسحوق ونقيع نبات الزعتر على وجود العديد من المركبات الثانوية مثل الجليكوسيدات والعفص والفلافونيدات والالكويدات والصابونين والانتوسيانين.

أظهرت نتائج التحليل الفيزيوكيميائي للزيت الأساسي على ان معامل الانكسار يساوي 1.5, ومؤشر حمض يساوي 1.12, مؤشر التصبين يساوي 308.55 ومؤشر استر بقيمة 307.43 .

ان دراسة التحاليل المضادة للاكسدة برهنت لنا ان الزيت الأساسية للنبات لها قدرة مضادة للاكسدة معتبرة مقارنة مع حمض الاسكوربيك.

أظهرت دراستنا حول حيوية الزيت الأساسية ضد الميكروبات ان لها مجال حيوي معتبر ضد البكتيريا والفطريات المدروسة حيث تم تقييمها بطريقتين (Aromatogram et micro-atmosphère) .

فتبين ان الزيت ذات نشاط قوي ضد السلالات البكتيرية (*Escherichia coli et Bacillus subtilis*) والسلالات الفطرية (*pseudomonas aeroginosa*) و(*Aspergillus braziliensis, Aspergillus flavus, et Candida albicans*).

ولتقييم اختبار مضاد للالتهابات استخدمنا اختبار لتثبيط الودمة بواسطة الكاراجينين حيث أظهرت النتائج ان الزيت الأساسية قد خفضت بشكل مهم الودمة مقارنة بمضاد الالتهابات المرجعي (Diclofénac).

الكلمات المفتاحية: الزعتر، الزيت الأساسية، النشاط المضاد للاكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للالتهابات.

Introduction

Introduction

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales, (**Iserin, 2001**). Grand nombre de plantes aromatiques, médicinales, des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et en agriculture, (**Mohammedi, 2006**).

L'Algérie, de par son aire géographique et sa diversité climatique riche en flore naturelle, recèle d'une gamme importante de plantes médicinales et aromatiques, faisant partie du grand patrimoine végétal de ce pays, (**Baba Aissa, 2011**).

La plupart des lamiacées à huiles essentielles sont surtout connues pour leur intérêt dans divers industries (parfumerie, liquoristerie, confiserie, produits cosmétiques, produits médicaux, agroalimentaire et vétérinaire), (**Bruneton, 1999 ; Bourgeois, 2007**).

Le genre *Origanum* appartient à la famille des lamiacées est l'une des plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien et antioxydant, (**Bouhdid et al, 2006**).

C'est dans ce contexte que nous sommes intéressées à l'étude de la plante de l'Origan (*Origanum floribundum*) qui est largement utilisée en médecine traditionnelle Algérienne et afin de justifier l'usage traditionnel de la plante par la population.

Le choix de cette plante est fait parce qu'il y a peu d'études concernant cette espèce et aussi car elle possède un effet antibactérien, antiviral, antifongique et antihelminthique puissant (**AitYoussef M.,2006**).

Nous avons donc suivi les étapes suivantes :

- Extraction de l'huile essentielle de la plante
- Evaluation des paramètres physico-chimiques de l'huile essentielle de l'Origan
- Etude phytochimique de la plante
- Etude de quelques activités biologiques de l'huile essentielle de l'Origan (antioxydante, anti-inflammatoire et antimicrobienne).

Chapitre 1 : Données bibliographiques

1. Les huiles essentielles

1.1. Historique et origine des huiles essentielles

L'utilisation des HE (parfums et aromates) remonte à l'antiquité. Les Égyptiens les utilisaient sous forme de bains aromatiques.

Les Romains et les Grecs utilisaient également les aromates pour parfumer leurs bains. Après la chute de Rome, une longue période de silence fit oublier l'utilisation des HE.

C'est au Moyen-Orient que les Arabes redécouvrirent la distillation des plantes, vers le 13^e siècle, grâce aux travaux de Gerber (**Sallé *et al.*, 1999**).

L'extraction des HE par distillation à la vapeur d'eau naît à l'époque de la révolution industrielle et permet le développement de produits alimentaires et de parfums. (**Debaissieux *et al.*, 2011**).

On comptait à cette époque une soixantaine de plantes dont on extrait les HE.

Le 16^e siècle fut aussi une époque fervante en bains aromatiques. A cette époque l'industrie des parfums naît à grasse et l'on déjà de l'HE de lavande et d'aspic.

Au 17^e siècle presque toutes les plantes d'Europe et du Proche-Orient sont distillées.

Au 18^e siècle, les premiers contrôles, afin de démasquer les falsifications font leur apparition.

Dans la deuxième moitié du 19^e siècle les premières analyses chimiques et la production des huiles synthétiques font déjà leur apparition. De tout temps dans les pays orientaux, les HE étaient utilisés pour parfumer les riches demeures. Les bains aromatiques sont toujours utilisés dans ces pays (**Sallé *et al.*, 1999**).

Au début du 20^e siècle, des chercheurs (CHAMBERLAND, CADEAC, MARTINDALE) démontrent, par leurs expérimentations, le pouvoir antiseptique des HE. Mais les véritables « pères » de l'aromathérapie sont Gattefossé puis Valnet et ses disciples (**Debaissieux *et al.*, 2011**).

Aujourd'hui, des médecins (Valnet, Duraffourd, Lapraz, d'Hervincourt, Belaiche) et des chercheurs de haut niveau (P.Franchomme), des pharmaciens (D.Baudoux) ont définitivement assis la réputation, l'efficacité et l'extraordinaire richesse des HE (**Debaissieux *et al.*, 2011**).

Chapitre 1 : Données bibliographiques

1.2. Définition

Selon Volak *et al.*, 1983, Les HE sont des liquides volatiles, réfringents, optiquement actifs, voisin des huiles, d'odeur tout à fait caractéristique. Elle se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire.

Les HE non ou peu miscibles avec l'eau, sont présentes dans nombre de plantes, conférant à chacune un parfum spécifique (Stumpf, 2012).

Selon la 8^e édition la pharmacopée européenne une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie.

En 2012, la pharmacopée française (11^e éd.) a introduit le concept d'huile essentielle médicinale, « huile essentielle au sens de la pharmacopée européenne, possédant des propriétés médicamenteuses » (Bruneton, 2016).

1.3. Répartition et localisation des huiles essentielles

Les HE n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs (Bruneton, 2016).

Elles se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 Familles (Gerhard,1993).

A titre d'exemple, nous citons certaines d'entre elles

- Les Asteraceae (Armoise, Camomille, Pissenlit)
- Les Lamiaceae (basilic, lavande, menthe, romarin)
- Les Myrtacées (camphrier, cannellier, laurier)
- Les Apiaceae (angélique, carotte, cerfeuil, persil)
- Les Abietaceae (épicéa, pin, sapin)
- Les Rutacées (citron, orange) (Baalioumer, 1987).

L'HE peut être extraire de différentes parties du végétal.

- Les feuilles : c'est le cas pour les HE d'arbre à thé, d'eucalyptus, de bigaradier.
- Les fleurs et les boutons floraux : camomille, giroflier, lavande, néroli.

Chapitre 1 : Données bibliographiques

- Les fruits ou les baies : genévrier, litsée citronnée.
- Les zestes : citron, orange, pamplemousse, bergamote, mandarine.
- Le bois ou l'écorce : cèdre de l'Atlas, bois de rose, santal blanc.
- Les racines : gingembre.
- Les graines : cumin, carotte cultivée.
- Les aiguilles : épinette noire, pin, sapin.
- La résine ou la gomme oléorésineuse : encens, térébenthine, myrrhe.

(Lefief, 2012)

1.4. Fonction des huiles essentielles

La fonction biologique des constituants des HE n'est pas toujours précisément connue.

Le plus souvent, il semble avoir une fonction écologique (Bruneton, 2016).

En effet, on considère qu'il s'agit de produits de déchets du métabolisme. Toutefois, certains auteurs pensent que la plante utilise son huile essentielle pour repousser les insectes, ou au contraire pour les attirer et favoriser la pollinisation.

D'autres, la considère comme une ressource énergétique, facilitant certaines réactions chimiques. D'autres part, elles conservent l'humidité nécessaire à la vie des plantes exposées à des climats désertiques (Belaiche, 1979).

1.5. Propriétés physiques

Selon (Bruneton, 2016 ; Paris *et al.*,1981) Malgré leurs différences de constitution, les HE possède en commun un certain nombre de propriétés physiques :

- Ce sont généralement des liquides à la température ordinaire.
- Leur volatilité les oppose aux « huiles fixes », à cette volatilité des HE sont liés leur caractère odorant et la possibilité de les obtenir par entraînement à la vapeur d'eau.
- Elles sont généralement incolores ou jaune pâle quand elles viennent d'être préparées. il existe cependant quelques exceptions (ex : huiles essentielles à azulène, de coloration bleue).

Chapitre 1 : Données bibliographiques

- Leur densité est, le plus souvent, inférieur à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau : ce sont les HE de sassafras, de cannelle ou de giroflier.
- Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire.
- Peu soluble dans l'eau, elles lui communiquent cependant leur odeur (eaux distillées aromatiques) ; elles sont solubles dans les alcools de titres élevés (différences avec les lipides), solubles dans les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques, elles sont liposolubles.
- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation (mais ne rancissent pas) elles ont tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux. Elles sont donc de conservation limitée.

1.6. Composition chimique

La détermination de la composition chimique a intéressée de nombreux chercheurs et les méthodes d'analyse chimique de plus en plus sophistiquées ont permis d'identifier un très grand nombre de constituants des HE (**Bakhachi *et al.*, 2010**).

Les HE sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et celui le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autres part. elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (acides gras, carotènes, etc.) (**Bruneton, 2016**).

Les principaux constituants des HE sont les suivants :

A. Composés terpéniques (terpénoïdes)

Dans le cas des HE, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : mono-et sesquiterpènes.

A.1. Mono-terpènes

Constituants les plus simples de la série des terpènes, les mono-terpènes sont issus du couplage de deux unités « iso-préniques ».

Chapitre 1 : Données bibliographiques

Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques (α et γ -terpinène, p-cymène) ou bicycliques (pinènes, camphène, sabinène). Ils constituent parfois plus de 90 % de l'HE (citrus, térébenthines). La réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules fonctionnalisées :

- Alcools (géraniol, α -terpinéol, bornéol)
- Aldéhyde : (citronellal)
- Cétones : (carvone)
- Esters : (acétate de menthyle)
- Ethers : 1,8-cinéole (on dit aussi eucalyptol)
- Phénols : (thymol) (**Bruneton, 2016**).

A.2. Sesquiterpènes

Un très grand nombre de sesquiterpènes sont des constituants habituels des HE des végétaux supérieurs et, en tant que tels, peuvent intervenir dans les propriétés pharmacologiques attribuées à ces fractions volatiles (**Bruneton, 1999**).

Biologiquement, bon nombre de structures sesquiterpéniques sont des phyto-alexines, d'autres, autres que l'acide abscissique qui n'est pas bio-génétiquement un sesquiterpène, semblent agir comme des régulateurs de croissance, d'autres enfin attirent les insectes ou agissent à l'encontre de ceux-ci comme des facteurs anti-nutritifs (**Bruneton, 2016**).

B. Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C₆-C₃) sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Ce sont très souvent des allyles- et propénylphénols, parfois des aldéhydes.

On peut également rencontrer dans les HE des composés en (C₆-C₁) comme la vanilline ou comme l'anthranilate de méthyle (**Bruneton, 2016**).

C. Composés d'origines diverses

Il s'agit là de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles. Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Compte tenu de leur mode de préparation,

Chapitre 1 : Données bibliographiques

les concrètes et les absolues peuvent en renfermer. Il en est de même pour les HE lorsqu'ils sont entraînables par la vapeur d'eau (**Bruneton, 2016**).

1.7. Action des huiles essentielles

Les arômes végétaux agissent sur notre organisme de plusieurs manières :

- Directement sur notre épiderme en favorisant, par activation de la microcirculation, la nutrition des tissus, la régénérescence cellulaire et l'élimination des déchets et toxines du métabolisme.
- Sur notre équilibre acido-basique.
- Sur notre équilibre nerveux, plusieurs familles de molécules aromatiques exercent un effet relaxant qui permet de diminuer les effets du stress.
- Sur notre énergie générale, action relaxante, action acidifiante.
- Au plus profond de notre inconscient, sur notre équilibre émotionnel, par l'odorat et par le cerveau limbique, la perception varie selon notre terrain biologique et culturel.

Cet effet sur les parties les plus intimes de notre cerveau constitue la clé de l'étonnant pouvoir qu'exercent sur nous les molécules odoriférantes des HE (**Roulier, 2005**). Certaines HE contiennent une centaine de constituants identifiables, voire davantage. C'est de cet ensemble que dépend leur action thérapeutique :

- Anti-inflammatoire (par ex. camomille vrai) ;
- Expectorante (par ex. thym faux pouliot) ;
- Diurétique (par ex. genévrier commun, bugrane épineuse) ;
- Antispasmodique, carminative, antifermentescible (par ex. carvi) ;
- Tonique gastrique, intestinal hépatique et biliaire (par ex. Angélique des bois) ;
- Stimulation biliaire (par ex. Menthe poivrée) ;
- Hyperémiant (par ex. genévrier commun) ;
- Sédatif (par ex. valériane officinale) ;
- Antibactérienne (par ex. Sauge des prés) ;
- Antivirale (par ex. millepertuis perforé) ;
- Antifongique (par ex. origan) (**Stumpf, 2012**).

1.8. Classification des huiles essentielles

L'indice aromatique est le rapporte entre le diamètre du halo d'inhibition obtenu par l'aromatogramme et celui d'une HE idéale dont l'action germicide serait maximale dans 100% des cas. **Le Dr Belaiche** a effectué sur une centaine d'HE des aromatogrammes, afin de trouver leur pouvoir spécifique sur les germes microbiens. Grace à l'indice aromatique, on peut classer les HE en trois groupes (**Sallé *et al.*, 1991**).

➤ Les huiles majeures

Elles agissent aussi bien sur les bacilles Gram positif ou à Gram négatif, ce sont des HE dont l'action bactéricide est constante et forte. Leur indice aromatique se situe entre (0,45) et (0,88). Par ordre d'efficacité nous trouvons : l'origan son indice est le plus élevé (0,88) ensuite viennent le thym (0,71), la cannelle (0,6), le girofle (0,51) et la sarriette (0,45) (**Sallé *et al.*, 1991**).

• Les huiles médiums

Elles sont moyennement antiseptiques. Elles ont une contribution efficace en cas de thérapie de relais. Leur indice aromatique se situe entre (0,45) et (0,10) tel que : le pin (0,35), l'eucalyptus (0,29), le genévrier (0,18), le serpolet (0,12) et le niaouli (0,10) (**Sallé *et al.*, 1991**).

• Les huiles de terrain

Ce sont des huiles dont l'indice est inférieur à 0,1 (**Sallé *et al.*, 1991**).

1.9. Extraction des HE

La technique d'extraction peut modifier les caractéristiques de l'HE (couleur, viscosité, solubilité, volatilité, constituants, mode d'utilisation). Le choix de la technique dépend surtout de la matière première végétale. C'est pourquoi le rendement de production des HE peut varier de 0.015% à plus de 20%. L'extraction est une opération capitale permettant d'obtenir des composés volatils, fragiles, dont il ne faut pas altérer la qualité (**Charlene Baudout, 2013**).

Chapitre 1 : Données bibliographiques

L'extraction des HE de la matière végétale peut être réalisée au moyen de nombreux et divers procédés, basés sur des techniques anciennes :

Distillation, Expression, Enfleurage ou Incision ou plus récentes : extraction sous irradiation micro-ondes ou par ultra-sons (**Luque *et al.*,1999**).

La distillation reste la méthode la plus prisée du fait qu'elle est facile à mettre en œuvre (**Ouis, 2015**).

1. Distillation

1.1. Hydrodistillation

C'est la technique la plus simple et la plus répandue. Elle consiste à immerger la matière première directement dans l'eau, puis l'ensemble est porté à ébullition. L'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. Les vapeurs formées sont condensées par un système de réfrigérant par courant d'eau. Lors de la distillation des HE, plusieurs phénomènes sont à la base d'échanges de matière entre les phases solides, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la qualité et le rendement de la production de ces essences végétales (**Hajji *et al.*, 1985**).

Les expérimentations conduites jusqu'à épuisement du substrat en essence montrent que la durée de la distillation est plus longue pour les organes de plantes ligneuses que pour les herbacées. Cette différence est fortement liée à la localisation des systèmes d'élaboration ou de stockage des HE qui sont soit à la surface ou à l'intérieur des tissus de la plante. De ce fait, ces structures ont une influence sur le déroulement de l'hydro-distillation, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée de l'opération d'extraction. Dans le cas où ces structures sont superficielles, la membrane externe ou la cuticule sont rapidement rompues lors de l'ébullition, les composés volatiles sont immédiatement évaporés.

Lorsque les HE sont sous cutanées, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur pour qu'elles puissent s'évaporer comme dans les sécrétions superficielles (**Ouis, 2015**).

Chapitre 1 : Données bibliographiques

1.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, la plante est traversée par un contact de vapeurs d'eau qui va tirer les substances volatiles hydrophobes. Après condensation, la séparation se fait par décantation. Cette méthode apporte une amélioration à la qualité de l'HE en minimisant les altérations hydrolytiques.

1.3. La distillation par les solvants organiques

Certaines HE ont une densité voisine de l'eau et le procédé par distillation à la vapeur d'eau ne peut être dans ce cas utilisé. C'est pourquoi on utilise les solvants. C'est une méthode très peu employée, elle représente 3 % des cas.

On met à macérer les fleurs ou les sommités fleuries dans du solvant, le plus souvent on utilise le benzène, puis on centrifuge pour récolter l'HE.

A proscrire pour l'utilisation thérapeutique, en raison de la toxicité des solvants (**Sallé et al, 1991**).

2.11. Toxicité des huiles essentielles

Les HE peuvent être toxique à des doses élevées. En générale chez l'homme l'injection de 10 à 30 ml d'une HE peut être mortelle, alors qu'à dose plus faible on note des troubles digestifs, de l'hypotension, de l'hypothermie et une confusion mentale (**Bruneton, 1999**). Leur absorption se fait principalement à travers la peau et les muqueuses du système respiratoires. Comme elles sont très concentrées, il convient de toujours les utiliser à faible dose et jamais pure sur la peau, sous peine d'irritations ou de réactions allergiques. Pour toute application, utiliser un support huileux, par ex de l'huile d'amande douce ou de tournesol (**Stumpf, 2012**).

Cet aspect de la connaissance des huiles essentielles est d'autant plus important que le développement de « thérapeutique » telles que l'aromathérapie (définie comme « le traitement des maladies par les essences de plantes ») ainsi que la connotation « produits naturels » attachée à ces produits conduisent à une utilisation souvent abusive et leur toxicité est démontrée (**Bruneton, 1993**).

Chapitre 1 : Données bibliographiques

Certains constituants des huiles essentielles administrée à forte doses comme les cétones (thuyone et pinocamphone) contenus respectivement dans le thuya, l'absinthe, l'ysop...provoquent des crises épileptiques et des effets secondaires (nausées, céphalées, ...). C'est pourquoi, la pratique de l'aromathérapie, sans l'avis d'un praticien, est déconseillée (Elabed *et al*, 2003).

2.12. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles doivent être conservées correctement pour préserver leur qualité. Avec le temps, elles s'oxydent, ce phénomène étant amplifié par la chaleur, l'air, la lumière...etc., Il faut les conserver dans un endroit frais, à l'abri de la lumière, dans du verre brun ou de l'aluminium vitrifié. Une essence bien distillée se conserve trois ans au moins (Benbouli, 2005).

Des flacons en verre teinté sont nécessaires à la bonne conservation des huiles essentielles. L'eau florale est très fragile et ne conserve pas longtemps. Elle doit être déposée dans des flacons de verre teinté à l'abri de la chaleur, et ce, pour une période d'environ trois mois (Daniel,1999).

3. Caractères généraux de la famille des lamiaceae

Plantes herbacées, buissons ou arbres ; tige souvent quadrangulaire en coupe transversale ; souvent à composés iridoïdes et glycosides phénoliques. Poils glanduleux à HE (comprenant des terpènes) et poils simples, non glanduleux, ces derniers pluricellulaires (et unisériés), ou en mélange de pluricellulaires et d'unicellulaires. La famille renferme de nombreuses espèces économiquement importantes soit par leurs HE, soit pour leur usage condimentaire, elles appartiennent aux genre *Mentha* (la menthe), *lavandula* (la lavande), *marrubium*, *nepeta* (l'herbe aux chat), *ocimum* (le basilic), *origanum* (l'origan), *rosmarinus* (le romarin), *salvia* (la sauge), *satureja* (la sarriette) et *thymus* (le thym).

De nombreux genres contiennent des espèces ornementales (Walter *et al.*,2002).

Les Lamiacées herbacées, annuelles ou vivaces, sont très nombreuses et très répandues en France, exemple les Thyms, les Lavandes, les Romarins sont surtout abondants dans les régions méditerranéennes (Moreau, 1960 in Elkalamouni, 2010).

Chapitre 1 : Données bibliographiques

4. Généralités sur l'Origan : *Origanum floribundum* Munby

4.1. Historique

L'origan a été utilisé depuis des siècles. Au moyen âge, l'origan était très employé ; il était considéré comme la panacée universelle (**Huguette, 2002**).

On a répertorié plus de quarante variétés d'origan réparties dans quatre familles botaniques différentes, mais toutes possèdent la même huile, donc les mêmes effets.

Le nom générique de la plante signifie « joie de la montagne ». Les chinois l'utilisent depuis des siècles pour traiter la fièvre, la diarrhée, la jaunisse et les blesseurs.

Dans le monde occidental, c'est surtout comme condiment dans les vinaigrettes, les salades, les sauces et sur les viandes qu'on l'habitude de s'en servir, mais on pourrait de nouvelles utilisations pour soulager l'arthrite, le rhume, la grippe, la congestion pulmonaire et pour favoriser la digestion (**Jourdain, 2008**).

Dioscoride, il y a deux mille ans, disait déjà de l'Origan qu'il était un des meilleurs remèdes pour ceux qui ont perdu l'appétit. Il est en effet, un apéritif remarquable. En même temps qu'il facilite la digestion en stimulant les estomacs paresseux et qu'il lutte contre la constipation.

Leclerc le recommandait particulièrement aux estomacs atoniques et dilatés (**Debuing et al, 2009**).

4.2. Etymologie

➤ « Origan » : Origanum désigne en latin (Origanon) et en grec (Origanos ou Origanon) diverses labiées aromatiques dont certainement divers origans. Le nom provient du grec « oros », montagne, et ganos, « éclat » :il signifie « parure des montagnes », et peut s'appliquer avec justesse à ces plantes dont la floraison est souvent remarquable (**Couplan, 2012**).

➤ « Floribundum » signifie très florifère (**Guide illustrée de la flore algérienne,2009**).

4.3. Nom commun

➤ **En arabe** : Zaàtar, Saàtar

➤ **En français** : Origan, Origan à inflorescence compacte (**Ait Youssef M.,2006**).

Chapitre 1 : Données bibliographiques

4.4. Systématique

Le genre *Origanum* fait partie de l'embranchement des spermaphytes, sous embranchement des angiospermes, classe des dicotylédones, famille des lamiaceae (**Quezel et Santa, 1962-1963**). Le polymorphisme de de genre, a amené **Letswaart en 1980 (in Kokkini, 1996)** a révisé sa classification et a le subdivisé en 10 sections, regroupant au total 38 espèces, (dont une avec 6 sous-espèces et une autre avec 3 variétés), ainsi que 17 hybrides. Dans cette nouvelle nomenclature, l'*Origanum floribundum* appartient à la section *Elongatispica*.

Du point de vue phylogénétique, cette espèce appartient au clade des Euangiospermes triaperturées, clade des Eudicotylédones, clade des Astéridées, l'ordre des Lamiales et la famille des Lamiaceae (APG III) (**Merbah et al, 2013**).

Selon **Goetz et al., 2012**, l'Origan est classé comme suit :

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermaphyta

Sous embranchement : Angiosperme

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida (Dicotylédones)

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae (labiatae)

Genre : *Origanum*

Espèce : *Origanum floribundum* Munby.

Chapitre 1 : Données bibliographiques

4.5. Description de la plante étudiée

L'origan est une plante aromatique, vivace ligneuse à la base, pouvant atteindre 20 à 80 cm de haut. (**Guide illustré de la flore algérienne, 2009**) L'Origan a un aspect sec, d'un vert rougeâtre et totalement recouvert d'un duvet (**Baba Aissa, 1991**).

- **Caractères botaniques**

L'origan est une plante endémique d'Algérie, elle pousse dans les pâturages et surtout en montagne jusqu'à 1500 d'altitude (**Guide illustré de la flore algérienne, 2009**).

- **Appareil végétatif**

Les caractères morphologiques végétatifs de l'*Origanum floribundum* (espèce vivace herbacée, aromatique médicinale et condimentaire) se particularise par :

La tige : prostrée à la base, les jeunes sont décombantes (**Quesel et Santa, 1962-1963**), dressée, grêle et à section carrée (**Guide illustré de la flore algérienne, 2009**), quadrangulaires et de court rameaux à l'aisselle sont de couleur verdâtres et pubescentes (**Machu, 2008**) (**in Merbah et al., 2013**). (**Figure1**)

La racine : est un rhizome (tige souterraine) ligneux avec des rejets filamenteux (racines adventives ; ceci lui configurant une bonne accroche (d'où son abondance dans les zones de hautes altitudes (**Machu, 2008**) (**in Merbah et al., 2013**)).

Les feuilles : sont ovales, pétiolées à bord peu denté, opposées et de grandeur variable, les feuilles inférieures sont étant plus grandes. (**figure 1**)

- **Appareil reproducteur**

L'inflorescence : en épis lâche, est composée de fleurs roses (**Guide illustré de la flore algérienne, 2009**). (**Figure 1**)

Les fleurs : sont hermaphrodites ; elles s'organisent en épis lâches (inflorescence indéfinie), disjointes après la floraison. Le calice à 5 dents courtes ; la corolle est à lèvres sensiblement égales (**Quesel et Santa, 1962-1963**), serait à lèvres plutôt régulières (**Merbah et al., 2013**)

Le fruit : est un tétrakène, ovoïde et lisse de couleur noirâtre (**Merbah et al., 2013**).

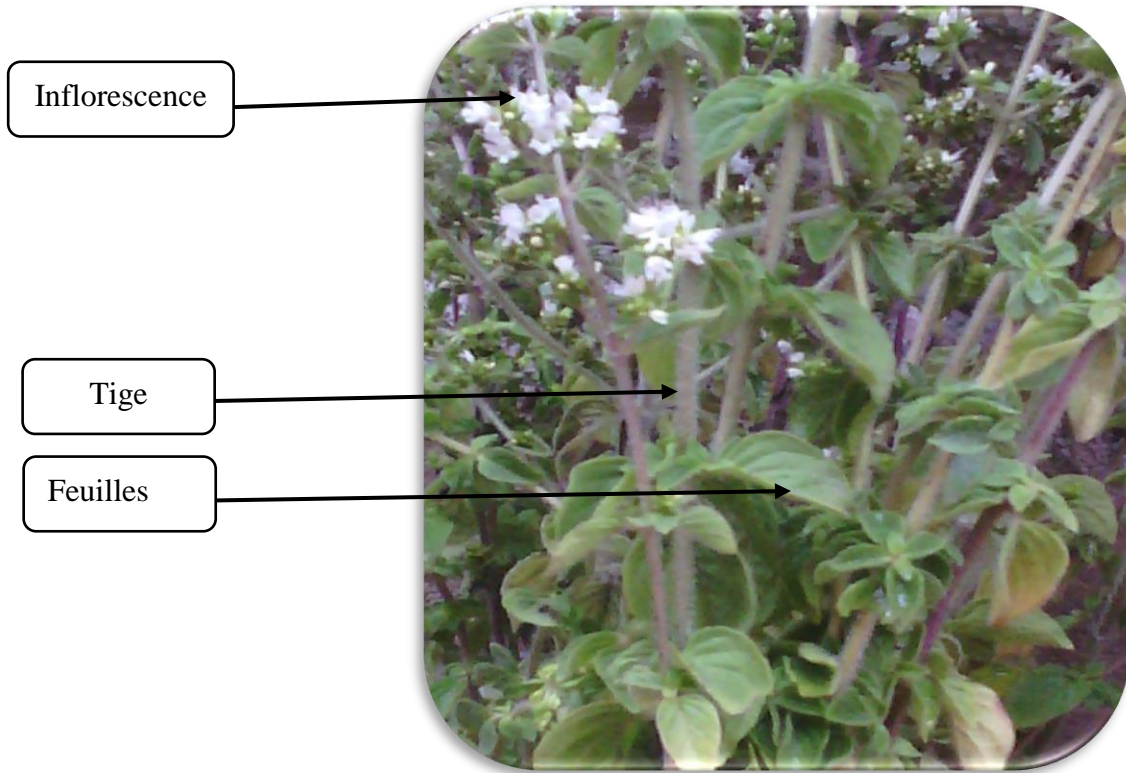


Figure 1 : Aspect morphologique de l'*Origanum floribundum* (Original, 2017)

4.6. Propriétés

- Antiseptique
- Antispasmodique
- Antitussif
- Apéritif
- Aromatique
- Carminatif
- Calmant
- Digestif
- Emménagogue

Chapitre 1 : Données bibliographiques

- Expectorant
- Stomachique
- Tonique...

A doses trop élevées, l'Origan pourrait se révéler excitant ; il convient donc de surveiller le dosage en cas de troubles cardiaques ou nerveux (**Baba Aissa, 2011**).

4.7. Cycle biologique

Le cycle de la vie de l'*Origanum floribundum*, commence durant la période d'automne et de printemps par l'apparition de premiers jeunes individus, ces individus se développent et commencent à fleurir à la fin du mois juin et leur cycle de vie s'achève par la fructification à la fin du mois de septembre.

Les populations d'*Origanum floribundum*, s'organisent en agrégats. Les individus sont regroupés en touffes dont le nombre de tiges diffère d'un individu à l'autre. Ces touffes sont reliées par des stolons (reproduction par voie végétative). L'espacement entre les touffes est variable (**Merbah et al., 2013**).

4.8. Ecologie

L'*Origanum floribundum* est une espèce rustique, qui bien qu'inféodée surtout aux milieux ouverts, peut s'accommoder à différents biotopes. En effet, dans le massif blidéen, cette espèce est rencontrée sur des pentes schisteuses, des pelouses, des matorrals, mais également dans les formations forestières à chêne vert et à cèdre. Elle occupe des tranches altitudinales allant de 700 à 1400 m environ, et des expositions variées (Nord, Sud, Nord Est...).

Elle se développe sur sol léger frais, meuble, humifère et bien drainé. Du point de vue bioclimatique, elle se retrouve en bioclimat subhumide et humide des étages thermo et méso-méditerranéen (**Merbah et al., 2013**), on l'y trouve dans les pâturages, surtout en montagnes (**Ait Youssef M., 2006**).

Chapitre 1 : Données bibliographiques

4.9. Répartition géographique

➤ En Algérie

Origanum floribundum est une espèce endémique de l'Algérie où elle est rare dans l'Atlas tellien et en grande Kabylie ;

Le genre *Origanum* appelé communément « Zaàtar » en Algérie, de la famille des lamiaceae est originaire du sud-Est méditerranéen et de l'Asie occidentale. Il compte 46 taxons sur le pourtour méditerranéen. En Algérie il est représenté par deux espèces spontanées phylogénétiquement proches : *Origanum glandulosum* Desf, endémique algéro-tunisienne et *Origanum floribundum* est localisé dans le secteur de l'Atlas blidéen et le secteur de la grande Kabylie (**Quesel et Santa, 1962-1963**). Sa présence dans le Sdamas chergui (Wilaya de Tiaret) signalée par KADIR (2005) (**Merbah et al., 2013**).

➤ Dans le monde

La culture de cette plante aromatique a lieu principalement en Espagne, sur le Bassin méditerranéen, mais également en Italie, en Inde, au Mexique, aux Etats-Unis. (**Huguet, 2002**)

Très répandue en Europe et en Asie dans les prés secs ou les pentes arides jusqu'à 2000 m (**Fleurentin, 2007**).

Les espèces courantes, plus ou moins communs dans le Tell, sont *Origanum glandulosum* Desf. (Esp. Nord-africain : Algérie, Tunisie). *O. hirtum* Batt. (Esp. Nord-africaine). *O. compactum* Benth (esp ouest méditerranéenne) et *O. floribundum* (esp endémique) (**Baba Aissa, 2011**). Les trois espèces du genre *Origanum* L. présentes en Algérie sont toutes trouvées en Kabylie.

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

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

Chapitre 1 : Données bibliographiques

-*Origanum floribundum.*, endémique présente en Algérie ou elle est rare dans l'Atlas tellien et en grande Kabylie ; on les trouve dans les pâturages, surtout en montagne (**Ait Youssef M.,2006**).

5. Huile essentielle de l'origan

L'origan est une plante riche en huile essentielle, prisée depuis des milliers d'années en médecine traditionnelle (**Guide illustrée de la flore algérienne, 2009**). L'huile essentielle de l'origan constitue un produit qui voit différentes utilisations industrielles, en alimentation, en parfumerie, en pharmacie et en aromathérapie.

L'origan renferme une essence de couleur jaune à brun foncé, d'odeur phénolique agreste, très aromatique reste toutefois très piquante, épicée et plus agressive que les autres huiles et de saveur amère, chaude et épicée. L'HE d'origan est particulièrement pourvue en phénols : le carvacrol et son isomère, le thymol (**Bardeau., 2009**).

5.1. Composition chimique

L'Origan renferme une huile essentielle (0,3-1,5%) riche en phénols (90% ; thymol, carvacrol (40-70%), γ -terpène, p-cymène, α -pinène, myrcène, thymol) (**Fleurentin, 2007**), des sucres amers et des tanins (**Huguette, 2002**).

La composition de l'huile essentielle varie fortement selon les races chimiques (**Fleurentin, 2007**).

La composition de cette huile essentielle expliquerait également l'action eupeptique, stimulant et cholérétique des parties aériennes de la plante (**Ait Youssef M, 2006**).

5.2. Usage de l'HE d'Origan

➤ En usage interne

L'huile contenue dans l'Origan est constituée de deux composés chimiques, le carvacrol et le thymol, des expectorants fort efficaces dans les cas de rhumes et de grippe. Il aide aussi à détendre les muscles du système digestif et favorise la digestion des aliments (**Jourdain, 2008**).

Chapitre 1 : Données bibliographiques

Elle est utilisée contre les bronchites chroniques, les toux, les tuberculoses, l'asthme et l'absence de règles (**Guide illustrée de la flore algérienne, 2009**). En aromathérapie, l'huile essentielle est traditionnellement utilisée par voie orale comme sédatif, antispasmodique, stimulant de l'appétit, contre l'aérophagie et les toux d'irritation, comme antiseptique des voies respiratoires et emménagogue (**Fleurentin, 2007**).

➤ En usage externe

L'HE d'Origan a un effet cicatrisant. Elle est indiquée comme un traitement d'appoint adoucissant et antiprurigineux des affections dermatologiques, comme trophique protecteurs dans le traitement des crevasses, écorchures, gerçures et contre les piqûres d'insectes (**Bruneton, 1999**).

Contre les rhumatismes musculaires et articulaires et la cellulite. C'est un antifongique, un antibactérien, un nématocide, un molluscicide et un insecticide (**Guide illustrée de la flore algérienne, 2009**).

En application local, elle est cicatrisante, utile dans les rhumatismes articulaires et contre les poux. On introduisait aussi un coton imbibé d'huile essentielle dans les dents creuses et cariées. En diffusion, elle est désinfectante (**Fleurentin, 2007**).

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Lieu de stage

L'étude et la réalisation de ce travail a nécessité des stages pratiques pendant une durée deux mois et demi , du mois d'avril au mois de juin dans trois structures différentes à savoir :

- Laboratoire de phytopharmacie de la faculté d'agronomie de l'université SAAD DAHLAB à Blida 01 pour l'extraction de l'huile essentielle.
- Le site de production Biotic du groupe pharmaceutique SAIDAL, situé au Gué de Constantine (Alger), dans lequel nous avons eu accès à ses différents laboratoires, dont il convient de citer :

- Laboratoire de physicochimie pour réaliser le screening phytochimique, l'étude du caractères physico-chimiques de l'HE et pour évaluer le pouvoir antioxydant.

- Laboratoire de toxicologie pour évaluer l'activité anti-inflammatoire.

- Laboratoire de microbiologie et d'hygiène de la wilaya du Blida : pour effectuer l'activité antimicrobienne.

2. Matériel utilisé

2.1. Matériel biologique

▪ Matériel végétal

Notre étude a porté sur l'origan (*Origanum floribundum*), espèce appartenant à la famille des labiées.

La quantité de la matière végétale utilisée est de 360 g de plante sèche pour l'extraction de l'huile essentielle.

Le matériel végétal utilisé est acheté chez un herboriste de la commune de l'Arbaâ à Blida, il s'agit de plante originaire de la région de Tachete (l'Arbaa).

▪ Matériel animal

L'étude réalisée au niveau de site de production Biotique du groupe pharmaceutique SAIDAL (laboratoire de toxicologie) a porté sur les souris albinos ayant les caractéristiques suivantes :

- Sexe : mâle et femelle

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

- Poids : 23 à 26 g
- Nombre : 20 souris ont servi pour la réalisation de l'activité anti-inflammatoire.
- Boisson : eau de robinet.
- T :20 à 25 C°
- Humidité : 50 %.

▪ Les souches microbiennes

Les souches microbiennes sont procurées par le service de microbiologie du laboratoire d'hygiène de la wilaya du Blida, le nombre retenu est de 8 : 5 souches bactériennes (2 Gram+ et 3 Gram-), 2 champignons et une levure. (**Tableau 1**)

Tableau 1 : les souches microbiennes testées

Souches microbiennes testées	Caractéristiques	
Souches bactériennes	Gram +	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Bacillus subtilis</i>
	Gram -	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Souches fongiques	Levure	- <i>Candida albicans</i>
	Champignons mycéliens	- <i>Aspergillus braziliensis</i> - <i>Aspergillus flavus</i>

1.1. Matériel non biologique

L'ensemble de matériel non biologique est illustré dans l'annexe n°1.

2. Méthodes

3.1 . Extraction de l'huile essentielle d'*origanum floribundum* par hydro-distillation

L'extraction de l'HE a été faite par la méthode d'hydro-distillation à l'aide d'un appareil de type clewenger (**figure 2**), les parties utilisées pour l'extraction sont les tiges, les feuilles et les sommités fleuries.

L'huile essentielle a été extraite par la technique d'hydro-distillation. Ce procédé consiste à placer dans un ballon la matière végétale et l'eau, le contenu est chauffé à l'aide d'une chauffe ballon (**pharmacopée européenne, 2004**).

L'huile essentielle se vaporise par chauffage en même temps que l'eau et est entraînée par la vapeur d'eau vers le réfrigérant où elles se condensent. A la sortie du réfrigérant, un liquide est recueilli, le distillat. Ce dernier est en général formé de deux phases non miscible :

- La phase aqueuse, la plus abondante est constituée d'eau dans laquelle sont dissoute très peu de constituants odorants.
- La phase organique : l'huile essentielle.

Mode opératoire

- Introduire 60g de matière végétale sèche dans un ballon remplie d'eau jusqu'au (3/4) de sa capacité et homogénéiser à l'aide d'une spatule.
- Chauffer à l'aide d'un chauffe ballon, après ébullition de l'eau, la vapeur d'eau entraîne les constituants volatiles dans le tube principale, pour ensuite se condenser dans le système de refroidissement et récupérés au niveau d'erlenmeyer.
- Après 35minutes, nous observerons l'apparition de la première goutte de distillat.
- La distillation est continuée jusqu'à 3 heures après les quelles nous avons récupérer l'huile essentielle.(figure 3)
- Plusieurs distillations (6 fois) ont été réalisées jusqu'à la récupération d'une quantité suffisante de l'HE.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

- La conservation de l'HE se fait dans un flacon ambré, hermétiquement fermé (**figure 4**) et à une basse température jusqu'à son utilisation.

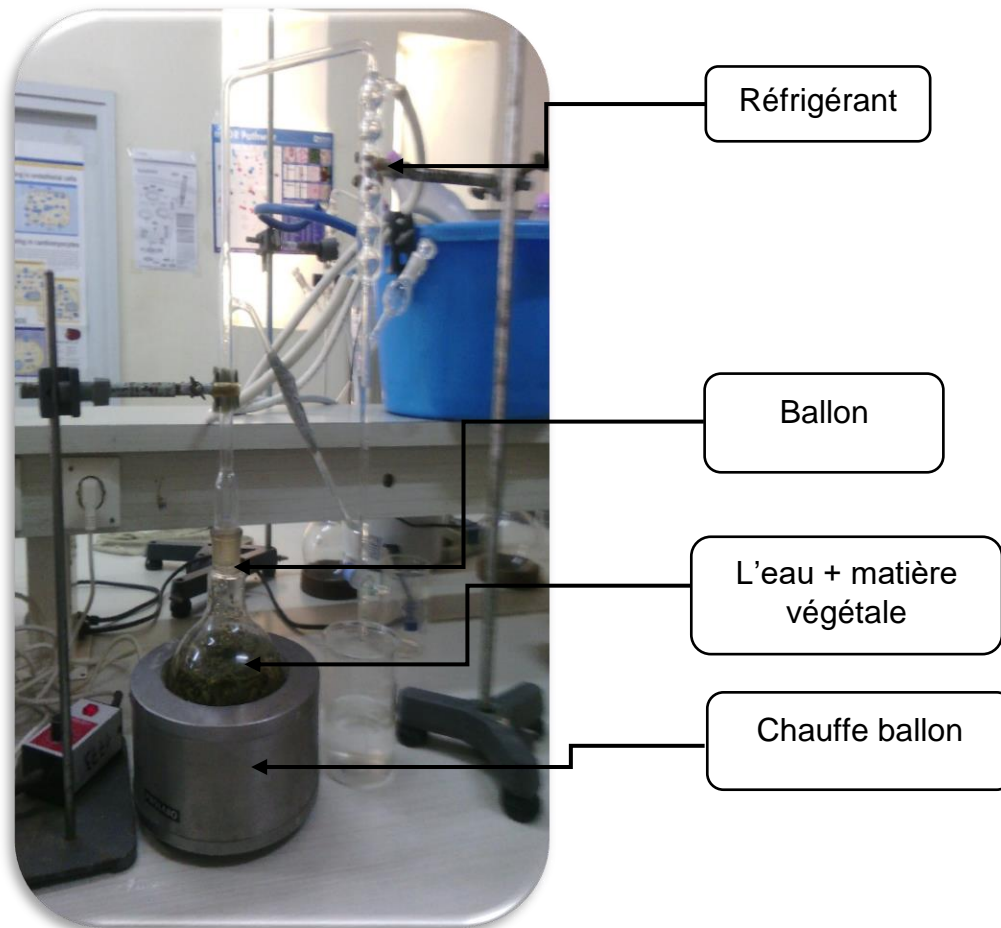


Figure 2 : Dispositif de l'hydro-distillation de type clevenger (**original, 2017**)

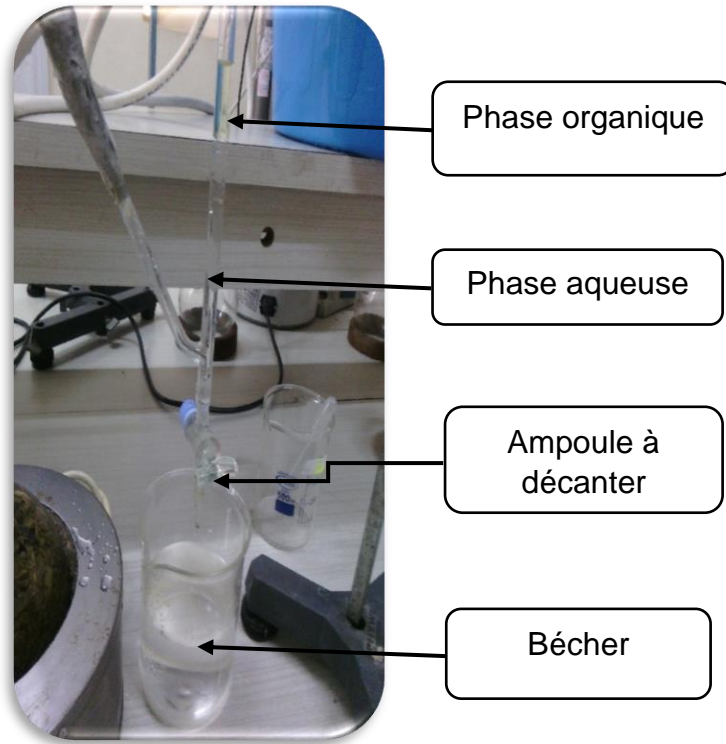


Figure 3 : processus de décantation et récupération des HE (Original,2017)

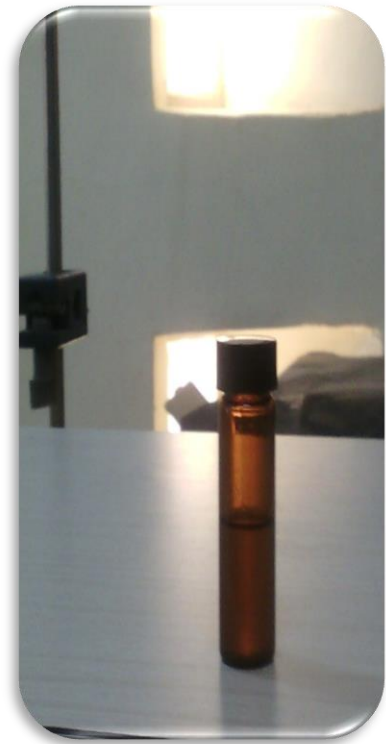


Figure 4 : Echantillon de l'HE récupérée dans un flacon teinté (Original, 2017)

3.2. Calcul du rendement en huiles essentielles

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle (RHE), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale sèche utilisée (M). Il est exprimé dans la même unité de masse multiplié par 100, comme suit :

$$RHE = M' / M \times 100$$

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

RHE : rendement en huile essentielle d'Origan

M' : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme

M : masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme et qui vaut 360 g.

3.4. Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité dans la poudre végétale est l'un des indices importants qui caractérisent la bonne qualité de celle-ci. Les plantes médicinales ne doivent pas contenir une quantité d'humidité dépassant la norme décrite par la pharmacopée européenne (**Pharmacopée Européenne, 2002**).

On met 1g de la poudre végétale dans un creuset en porcelaine préalablement séché et pesé : l'ensemble est placé dans une étuve réglée à une température comprise entre 100 et 105°C durant 2 heures.

On calcule le pourcentage d'eau contenu dans la poudre par la formule suivante (**Pharmacopée européenne, 2005**).

$$X \% = ((M - M') / M) \times 100$$

Avec :

X% : taux d'humidité de la poudre

M : masse de la prise d'essai en gramme

M' : masse de la prise d'essai après séchage en gramme.

3.5. Caractérisation de l'HE d'*Origanum floribundum* Munby

La qualité d'une HE et sa valeur commerciale sont définies par des normes de normalisation ont été déterminées par plusieurs organisations connues à l'échelle mondial, en fixant les conditions opératoires et en mettant au point des monographies pour la caractérisation des : ISO, AFNOR, et la Pharmacopée.

La caractérisation de l'HE de l'origan consiste à :

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

- L'appréciation des caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur et flaveur).
- La détermination des indices physico-chimiques (indice de réfraction, indice d'acide, pouvoir rotatoire...etc.).

3.5.1. Caractéristiques organoleptiques (pharmacopée Européenne, 2001)

- **Aspect** : l'aspect d'une HE apparait sous forme solide, liquide, ou bien solide-liquide.
- **Odeur** : l'odeur est un sens chimique très sensible, et d'après la nature du système olfactif, une substance pour être sentie doit être volatile.
- **Couleur** : la couleur d'une HE dépend des produits qui constituent l'HE.

3.5.2. Indices physico-chimiques

- **Indice de réfraction** : Norme NF T 75-112

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

L'indice de réfraction des HE est généralement élevé, il est supérieur à celui de l'eau à 20°C (=1,3356) ceci grâce à leur richesse en composants qui devient la lumière polarisée (AFNOR, 2000).

L'indice de réfraction N_d^t à la température de référence $t = 20^\circ\text{C}$ (N_d^{20}), est déterminée par la formule suivante :

$$N_d^{20} = N_d^{t'} + 0,00045(t' - t)$$

Avec :

t : température de référence (20°C) ;

t' : température d'expérience ;

$N_d^{t'}$: La valeur obtenue à la température t' .

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Mode opératoire

Placer le produit à l'aide d'une pipette pasteur dans la cellule de mesure jusqu'au trait signal, refermer le couvercle. Au bout de 15 secondes (temps nécessaire pour que l'appareil soit stabilisé à 20°C), observer par l'oculaire, et régler avec les deux boutons, jusqu'à la localisation du trait signal au centre de la cellule, une ligne de séparation entre la partie claire et la partie sombre apparaît dans le champ de vision.

- **Pouvoir rotatoire** : Norme NF T 75-113

Il s'agit de l'angle exprimé en milliradians et/ou degrés d'angle, dont tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde 589,3 nm + ou - 0,3, correspond aux raies D de sodium, lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100 nm dans des conditions déterminées de température (AFNOR, 2000).

Mode opératoire

Amener l'échantillon à une température spécifiée et introduire dans le tube en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée.

Placer le tube dans le polarimètre, et lire l'angle de rotation dextrogyre (+) ou lévogyre (-) de l'échantillon pour essai sur l'échelle de l'appareil (Pharmacopée, 2005).

Calcul :

Il est calculé suivant la formule :

$$\alpha_p^T = A/L \times 100$$

Avec

A : Est la valeur de l'angle de rotation en degré.

L : Est la longueur du tube utilisé en mm.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

- **Indice d'acide (I_A)** : Norme NF T 75-103

L'indice d'acide (I_A) est le nombre qui exprime en milligrammes. La quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 g de substance (AFNOR, 2000).

Mode opératoire

Dissolvez 1 g d'huile essentielle, dans 50 ml d'un mélange à volumes égaux d'alcool R et d'éther R'. Le solvant doit être neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium 0,1 M en présence de 0,5 ml de solution phénophtaléine R_1 . Après dissolution, titrez par l'hydroxyde de potassium 0,1M. Le titrage est terminé lorsque la couleur rose persiste pendant 15 secondes au moins (n ml d'hydroxyde de potassium 0,1M).

Calcul :

Cet indice est calculé par la relation :

$$I_A = \frac{5,61 \times n}{M}$$

Avec

5,61 : Eq de KOH ;

n : volume de KOH ;

M : masse de l'échantillon.

- **Indice de saponification (I_S)**

L'indice de saponification (I_S) est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance (AFNOR,2000).

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Mode opératoire

Dans une fiole de 250 ml de verre et munie d'un réfrigérant à reflux, on introduit la prise d'essai (1g) de l'huile essentielle. On ajoute 25 ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5M. On adapte le réfrigérant et on chauffe à reflux pendant 30 min. on ajoute 1 ml de solution de phénophtaléine R_1 et on va titrer immédiatement (alors que la solution est encore chaude) par l'acide chlorhydrique 0,5M (n_1 ml d'acide chlorhydrique 0,5M). On effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions (n_1 ml d'acide chlorhydrique 0,5M),

Calcul

Cet indice est calculé par la relation :

$$I_s = \frac{28,25 \times (n_2 - n_1)}{M}$$

Avec

28,25 : Eq de HCL ;

n_1 : volume de HCL pour l'échantillon ;

n_2 : volume de HCL pour le blanc ;

M : pesé de l'échantillon.

• Indice d'ester (I_E) : Norme NF T 75-104

L'indice d'ester I_E exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des esters présents dans 1g de substance. Il est calculé à partir de l'indice de saponification et de l'indice d'acide (AFNOR, 2000).

Indice d'ester = indice de saponification – indice d'acide

$$I_E = I_S - I_A$$

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

3.6. Screening phytochimiques

Le but est de mettre en évidence la présence ou l'absence des principaux métabolites secondaires.

Les tests sont réalisés soit sur la poudre, soit sur un infusé préparé avec 100 ml d'eau distillée bouillante sur 10 g de poudre. Les tests ont été effectués à SAIDAL, Selon le protocole de Bruneton (1999).

- **Préparation de l'infusé**

On met 10 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée bouillante, on laisse infuser pendant 15 min, puis on filtre à l'aide d'un papier filtre.

- **Les tanins**

Dans un tube à essai contenant 5 ml de l'infusé, on rajoute quelques gouttes d'une solution de $FeCl_3$ à 5%. La réaction donne une coloration bleu noire en présence des tanins.

- **Les anthocyanes**

On rajoute quelques gouttes d'HCL à 5 ml d'infusé, la réaction donne une coloration rouge en présence des anthocyanes.

- **Les flavonoïdes**

A 5 ml d'infusé additionner 5 ml d'HCL, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool iso-amylique. La réaction donne une coloration rouge orange en présence des flavonoïdes.

- **Les saponosides**

A 2 ml d'infusé on rajoute quelques gouttes d'acétate de plomb, la formation d'un précipité blanc indique la présence des saponosides.

- **Les alcaloïdes**

Faire macérer 5 g de poudre végétale humecté avec l'ammoniaque (1/2) pendant 24h dans 50 ml d'un mélange éther chloroforme (3/1), le filtrat est épuisé par l'acide chlorhydrique 2N. des

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

réactions de précipitations sont effectuées sur la solution chlorhydrique, en présence d'alcaloïdes, le réactif de Dragendorff donne un précipite rouge.

- **Les coumarines**

Prendre 3 à 5 ml de l'infusé, puis rajouter 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10 % et quelques gouttes de HCL à 10 % jusqu'à l'obtention d'un milieu faiblement acide, l'apparition d'un trouble indique la présence des coumarines.

- **Les glucosides**

Quelques gouttes d'acide sulfurique concentré H_2SO_4 sont ajoutées à 2 g de poudre. Le développement d'une coloration rouge révèle la présence des glucosides (**Bouquet, 1971**) et (**Moyse, 1976**).

- **Les terpènes**

Prendre 5 ml d'extrait de 10 % mélanger avec 5 ml d'acide phosphomolybdique et 5 ml d'acide sulfurique concentré H_2SO_4 (96 %) (**Gherib, 1998**).

- **Leuco anthocyanes**

2 g de poudre sont portés au bain marie bouillant pendant quelques minutes dans 20 ml d'un mélange de propanol/acide chlorhydrique (1/1). Une coloration rouge se développe en présence des leuco anthocyanes (**Bouquet, 1971**) et (**Moyse, 1976**).

- **L'amidon**

A 2 g de poudre végétale on ajoute quelques gouttes d'Iode (I_2). Une coloration bleue violette est obtenue en présence de l'amidon (**Bouquet, 1971**) et (**Myose, 1976**).

- **Mucilage**

A 1 ml d'infusé, on ajoute 5 ml d'éthanol absolu. L'obtention d'un précipite floconneux après agitation indique la présence de mucilage (**Bouquet, 1971**) et (**Myose, 1976**).

3.7. Evaluation des activités biologiques de l'HE d'Origan

3.7.1. L'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum* a été évaluée in vitro par la méthode d'inhibition du radical DPPH.

En général, le pouvoir antioxydant d'une HE testée est estimé par comparaison avec un antioxydant de synthèse qui est l'acide ascorbique (vit C).

• Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH*

La technique a été réalisée suivant le principe et le protocole suivants :

Principe

Pour étudier l'activité antioxydante des HE, nous avons utilisé le test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH), selon le protocole décrit par **Kim et al., (2003)**.

Le DPPH, radical libre de couleur violette est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires.

L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire des composés.

Mode opératoire

Le protocole de l'activité antioxydante sera évalué comme suit :

- Dissoudre 2 mg de DPPH dans 50 ml de méthanol.
- Préparer la solution d'HE de l'Origan : 500 mg d'huile essentielle sont dissous dans ml de méthanol (solution mère).
- La solution mère subira des dilutions pour avoir différentes concentrations.
- Dans des tubes secs et stériles, de chaque concentration sont ajoutés à 4 ml de la solution de DPPH.
- Un contrôle négatif est composé de 4 ml de la solution de DPPH et de 1 ml de méthanol.
- Pour chaque concentration, le test est répété deux fois.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

- Les tubes après agitation sont mis dans endroit sombre, et soumis à une température ambiante pendant 30 minutes.
- La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par spectromètre.

Un Contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique (Vit C), l'absorbance de l'acide ascorbique est mesurée dans les mêmes conditions que celle de l'huile essentielle.

Le pouvoir d'inhibition est calculé par une formule spécifique. Le pourcentage d'activité (**I%**) est donné par la formule suivante :

$$I\% = (Abs_{CONTROLE} - Abs_{TEST} / Abs_{CONTROLE}) \times 100$$

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

Abs_{CONTROLE}: Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution méthanol + DPPH.

Abs_{TEST} : Absorbance à 517 nm de l'échantillon.

La valeur de la concentration efficace EC (50) ou bien la concentration inhibitrice (IC50) correspond à la concentration du substrat, qui cause la perte de 50 % de l'activité du DPPH (Wang et al., 1998).

3.7.2. L'activité anti-inflammatoire

La méthode utilisée est celle de (WINTER, 1962).

Le principe

Le principe de cette méthode consiste à administrer les doses appropriées des substances à contrôler à un groupe de souris blanches, ensuite provoquer une inflammation locale en injectant la carraghénine par voie sous plantaire dans la patte postérieure. Parallèlement,

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

procéder de même à un deuxième groupe de souris, mais en administrant de la solution physiologique au lieu du produit à contrôler (témoin négatif) et le médicament de référence le diclofénac (témoin positif). La comparaison de l'évolution de l'inflammation à travers le poids de la patte gauche et droite chez les groupes expérimentaux et le groupe témoin renseigne sur la propriété anti-inflammatoire de l'HE testé.

Protocole expérimental

Mettre les souris à jeun pendant 18 heures avant l'expérience. Au moment de l'expérimentation, peser les souris et les répartir en quatre lots homogènes de cinq souris par lot (**figure 5**).



Figure 5 : La répartition des 4 lots des souris (**originale, 2017**)

Au temps T0 : (gavage)

Administrer aux quatre lots par voie orale (figure 6) les suspensions suivantes :

- Lot témoin négatif :(0,5 ml de solution physiologique (Na Cl à 0,9%) dénuée de toute activité anti-inflammatoire.
- Lot témoin positif (référence) : 0,5 ml de solution du Diclofénac de sodium.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

- Lot essai 1 : 0,5 ml de l'HE de l'Origan à la dose de 2 mg/ml d'eau distillée.
- Lot essai 2 : 0,5 ml de l'HE de l'Origan à la dose de 4 mg/ml d'eau distillée.

Pour chaque lot essai, nous avons rajouté quelques gouttes de tween 80 pour faciliter la dispersion de l'HE dans l'eau distillée.



Figure 6 : gavage des souris par les différentes solutions (originale, 2017).

Au T0 + 30min

Injecter pour les quatre lots 0,02 ml de la solution de carraghénine à 1% par voie sous plantaire au niveau de la patte postérieure gauche (**figure 7**).

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

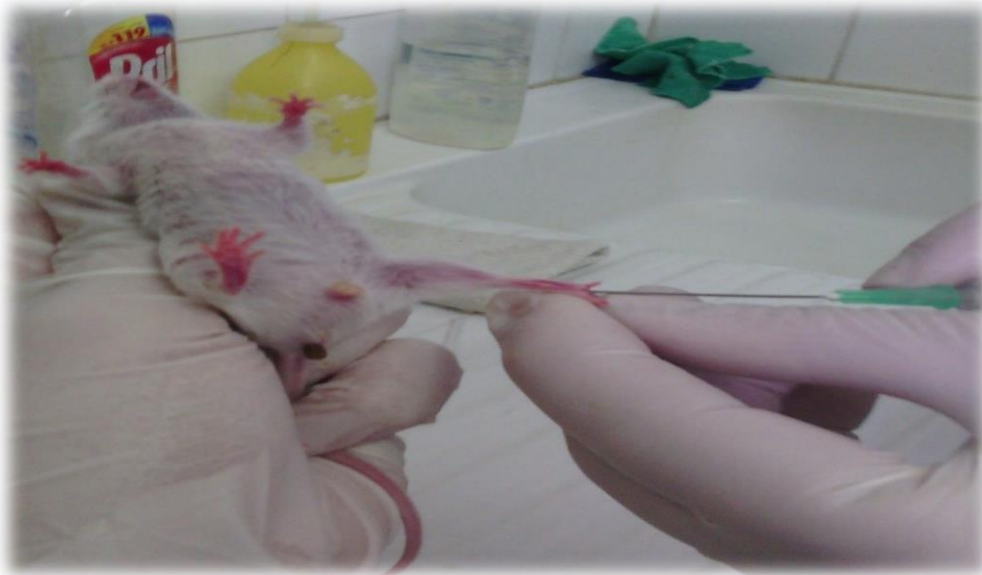


Figure 7 : Injection de la carraghénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure de la souris. (Originale, 2017).

Au temps T0 + 4h

Sacrifier les souris et couper les pattes postérieures droites et gauches (figure 8). Ces dernières sont pesées par une balance analytique.



Figure 8 : la coupe des pattes postérieurs droites et gauches des souris (Originale, 2017).

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Expression des résultats

- Calculer les moyens arithmétiques des poids de la patte gauche et de la patte droite pour chaque lot.
- Calculer le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% d'œdème) par la formule suivante

$$\% \text{ d'augmentation d'œdème} = \frac{\text{Moyenne des poids de la patte gauche} - \text{Moyenne des poids de la patte droite}}{\text{Moyenne des poids de la patte droite}} \cdot 100$$

- Calculer le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \cdot 100$$

3.7.3. L'activité antimicrobienne

Tous les modes opératoires utilisés pour les tests microbiologiques sont validés au niveau du laboratoire microbiologique d'hygiène de feroudja (Blida). L'effet antimicrobien de l'HE de l'Origan in vitro a été mis en évidence par deux méthodes :

la méthode de diffusion sur gélose ou l'aromatogramme et la méthode micro-atmosphère.

➤ Aromatogramme de l'HE de l'Origan

But et principe

Le but de cette technique repose sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne d'HE.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Le principe consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes mis en contact avec l'HE, par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, des disques absorbants de papier imprégnés d'HE.

Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier.

L'HE diffuse à partir du disque au sein de la gélose et détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. Observer ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'HE. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

Mode opératoire

L'aromatogramme ou méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisé par **Zaika et al (1988)**.

Tremper un écouvillon stérile dans la suspension microbienne (bactériennes et fongiques), puis étaler en stries sur une boîte de pétrie stérile de 9,5 mm de diamètre (coulée précédemment par le milieu de culture approprié) (Sabouraud pour les champignons-levures et Muller Hinton pour les bactéries) en la tournant horizontalement pour couvrir toute la surface.

A l'aide d'une pince stérile, prendre un disque en papier absorbant (papier buvard de 9 mm de diamètre) dont imbiber l'extrémité avec l'HE d'Origan, ce dernier est déposé sur la surface géloseensemencée par les microorganismes à tester.

On laisse diffuser sur la paillasse pendant 30 min, puis on incube à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les champignons et les levures.

Après incubation, les zones d'inhibition ont été estimées, et le diamètre est mesuré en mm. L'estimation de l'activité antimicrobienne est basée sur une échelle de mesure mise en place par **Keshavarz et al., (1996)** et **Meena et Sethi (1994)** et **Ela et al (1996)**. Ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 04 classes :

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

- ✓ Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28mm.
- ✓ Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 16 mm et 28mm.
- ✓ Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 10 mm et 16mm.
- ✓ Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10mm.

➤ **Technique de micro-atmosphère (diffusion en phase vapeur)**

Nous avons utilisé cette méthode dans le but d'apprécier les propriétés inhibitrices de la phase volatile de l'HE. La différence entre cette méthode et l'aromatogramme réside dans la position du disque imprégné. Ce dernier est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétrie, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. De la même manière que l'aromatogramme, nous avons appliqué 3 doses croissantes en HE. En premier lieu, 20 μ l d'HE est déposée sur un disque de papier filtre de 20 mm de diamètre. Dans le 2^{ème} essai, un disque de 40 mm a été imprégné par 40 μ l d'HE alors que pour le dernier, un disque de 60 mm a été chargé par 60 μ l d'HE. Le diamètre du disque diffère selon la quantité d'HE à imprégner afin d'obtenir un bon étalement et, par conséquent, une meilleure évaporation de l'HE.

La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été menés de la même manière que la première méthode. La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à température adéquate. Il se produit une évaporation des substances qui, en contact avec les germes ensemencés, va inhiber leur croissance. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par une zone translucide sur la gélose, de contour plus ou moins nette et à tendance circulaire (**Zaika, 1988**).

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. Le rendement en huile essentielle

Nous avons pu récupérer une quantité de 6,02 ml d'HE à partir de 360 g de plantes sèches, par décantation et élimination de l'hydrolat. Le rendement en HE est présenté dans le tableau 2 :

Tableau 2 : rendement en huile essentielle.

Poids de la plante sèche	Rendement en HE
360 g	1,67 %

Après l'extraction on obtient un rendement en HE (1,67%)

1. Caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques de l'HE d'*Origanum floribundum* sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : caractères organoleptiques de l'huile essentielle de l'*Origanum floribundum*.

	Couleur	Odeur	Aspect
HE d' <i>Origanum floribundum</i>	Jaune pâle	Fortement aromatique caractéristique du l'Origan	Liquide
HE d' <i>Origanum</i> (AFNOR,2000)	Jaunâtre à brun foncé	Caractéristique, fortement aromatique	Liquide

Après extraction nous avons obtenus une huile essentielle liquide de couleur jaune pâle avec une odeur très fortement aromatique caractéristique du l'Origan et qui sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes **AFNOR (2000)**.

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

2. Indices physicochimiques

Les résultats des paramètres physico-chimiques de l'HE d'Origan sont rapportés dans le tableau 4.

Tableau 4 : valeurs des indices physicochimiques de l'HE de l'*Origanum floribundum*.

	Indices chimiques			Indices physiques	
	Indice d'acide	Indice de saponification	Indice d'ester	Indice de réfraction	Pouvoir rotatoire
Résultats obtenus	1,12	308,55	307,43	1,5	0,4
AFNOR (2000), Pharmacopée européenne(2014)	/	300-400	/	1,5-1,51	-5° à 2°

Nous remarquons que les paramètres physiques de l'HE sont en accord avec ceux mentionnés par les normes d'AFNOR, (2000) et la pharmacopée européenne (2014).

- Les indices chimiques

• L'indice d'acide (IA)

Selon **Kpoviessi *et al.*, 2004**, l'IA montre le taux des acides gras libres dans l'HE. Une valeur élevée indique une dégradation d'HE (hydrolyses des esters) durant sa conservation. Inversement, un IA inférieur à 2 est un acide de bonne conservation de l'HE.

L'IA obtenue est de 1,12 cette valeur mentionne que l'HE obtenue est stable et ne provoque pas d'oxydation (bonne conservation d'HE extraite).

• L'indice de saponification (IS)

L'indice de saponification (IS) de l'HE d'Origan est de 308,55. Cet indice rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras. Il caractérise le poids moyen de la lumière grasse auquel il est inversement proportionnel (plus le poids moléculaire est élevé plus l'indice de saponification est faible).

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

La valeur obtenue de l'IS est conforme aux normes de **la pharmacopée européenne (2014)**, qui a un intervalle [300-400] pour une prise d'essai [0,5-1] g.

D'après les résultats nous estimons que le poids moléculaire de l'HE d'Origan est faible.

- **L'indice d'ester (IE)**

L'IE nous indique la présence des acides gras sous forme de triglycérides. L'IE trouvé (307,43) est plus supérieur à celui de la fiche technique d'*O.compactum* qui est égale à 3.

On peut dire que la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présents dans 1 g d'HE est de 307,43.

- **Les indices physiques**

- **L'indice de réfraction**

L'indice de réfraction (IR) de l'HE d'Origan obtenu est de 1,5. L'indice de réfraction est un paramètre qui nous renseigne aussi, sur la pureté d'une HE, cependant cet indice est supérieur à celui trouvé par **Abdullah Ijaz (2009)** pour *O.vulgare* (1,499).

La valeur de l'IR de notre échantillon, indiquent la faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques (**Kango et al., 2004**).

- **Pouvoir rotatoire**

Ce paramètre physique nous renseigne sur les composés responsables de la déviation du plan de polarisation (composés chimiques ayant une asymétrie dans leur composition chimique).

3. Screening phytochimique de la plante

La caractérisation phytochimique de la plante a pour but, de mettre en évidence la présence ou l'absence des métabolites secondaires. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5.

+ : positive

- : négatif

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

Tableau 5 : résultats du screening phytochimique d'*Origanum floribundum* Munby L.

Les métabolites secondaires	Les résultats obtenues
Les glucosides	+
Les tanins	+
Les flavonoïdes	+
Les anthocyanes	+
Leuco-anthocyane	+
Mucilage	-
Les saponosides	+
Les alcaloïdes	+
Les amidons	-
Les terpènes	+
Les coumarines	+

Le test phytochimique réalisé sur la poudre et l'infusé d'*Origanum floribundum*, révèle la présence de plusieurs familles de composés tels que : les tanins ; les flavonoïdes ; les saponosides ; les glucosides ; les anthocyanes ; les alcaloïdes et les coumarines, on note aussi la présence des terpènes, et leuco-anthocyanes.

4. Détermination du taux d'humidité de la poudre sèche

Le taux d'humidité a été déterminé pour *Origanum floribundum* à l'état sec sur la poudre, Nous avons trouvé un taux d'humidité égale à 9,88 % de la poudre, ce qui montre que l'échantillon sur lequel nous avons travaillé se prêtait à une bonne conservation (<15%) d'après les recommandations de la **pharmacopée européenne (2002)**.

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

Dans le but d'extraire le maximum d'HE, l'eau a été éliminée pour concentrer les principes actifs de la plante et pour avoir un meilleur rendement en HE (Spiridon, 2002).

5. Evaluation de l'activité antioxydante

La mesure du pourcentage d'inhibition du DPPH, provoqué par la présence de notre huile après 30 minutes, a permis de déterminer le pouvoir antioxydant de chaque concentration d'huile. L'approche la plus simple dans l'interprétation des données, est de tracer le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'antioxydant testé. Les résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH par l'HE d'*Origanum floribundum* ainsi que ceux de la vitamine C sont rapportés dans le tableau 7 et la figure 9.

Tableau 6 : pourcentage de l'activité anti-radicalaire de l'HE et de la Vit C.

		Acide ascorbique		Huile essentielle	
Concentration mg/ml		DO	I %	DO	I %
SM	100 mg/ml	0,017±0,001	97,16	0,032±0,001	94,66
S1	20 mg/ml	0,034±0,003	94,32	0,046±0,001	92,32
S2	4 mg/ml	0,054±0,002	90,98	0,271±0,003	54,76
S3	0,8 mg/ml	0,11±0,001	81,64	0,324±0,002	45,91

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

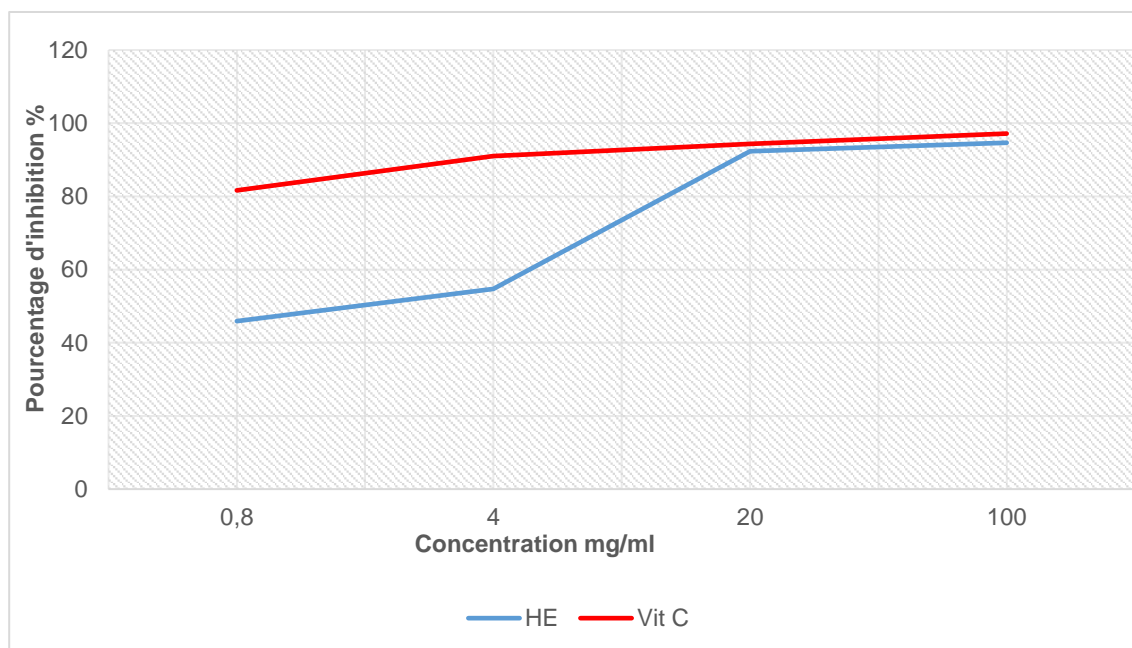


Figure 9 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration de l'HE d'Origan et le standard (l'acide ascorbique).

L'activité antioxydante de l'HE étudiée et de la vit C augmente en fonction de la concentration. Elle débute de 45,91 pour la concentration de 0,8 pour l'HE d'Origan et atteint le seuil de 94,66 pour la concentration 100 mg/ml. Il apparaît clairement que l'HE d'Origan présente une capacité de réduction du radical DPPH comparable à celles de l'acide ascorbique (vit C) à partir des concentrations 20 mg/ml. Mais qu'en comparant les valeurs des EC50, on constate que l'acide ascorbique (EC50=0,49 mg/ml) possède une activité antioxydante supérieure à celle de l'huile essentielle (EC50=2,5 mg/ml).

La forte activité de l'HE peut être due à sa richesse en composés phénoliques (**fleurentin, 2007**), ces dernières ont la capacité de piéger les radicaux libres.

Plusieurs travaux montrent que les composés phénoliques jouent un rôle important dans l'extraction des radicaux libres. En plus du thymol, nous retrouvons le carvacrol, γ terpinène (**Sharififar et al., 2007**), p-cymène (**Bouhdid et al., 2008**), carvacrol méthyl éther et thymol méthyl éther. Tous ces composants d'HE d'Origan pourraient exercer à côté d'autres composés mineurs un effet de synergie entre eux et donneraient une activité antioxydante plus importante (**Loizzo et al., 2009**).

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

6. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Pour mieux comprendre l'effet anti-inflammatoire de notre huile, nous avons calculé le pourcentage de l'augmentation de l'œdème et le pourcentage de réduction de l'œdème. Les résultats sont rapportés dans la figure et le tableau ci-dessous.

Tableau 7 : pourcentage d'augmentation et de réduction de l'œdème

Lots	Poids des pattes (g)		% d'œdème	% de réduction de l'œdème
	Gauches	Droites		
Témoin	0,156±0,031	0,104±0,005	50%	/
Référence (Diclofénac)	0,129±0,010	0,113±0,008	14,16%	71,68%
HE(E1)= 2 mg/ml	0,154±0,303	0,120±0,018	28,33%	43,34%
HE (E2)= 4 mg/ml	0,120±0,006	0,106±0,010	13,21%	73,58%

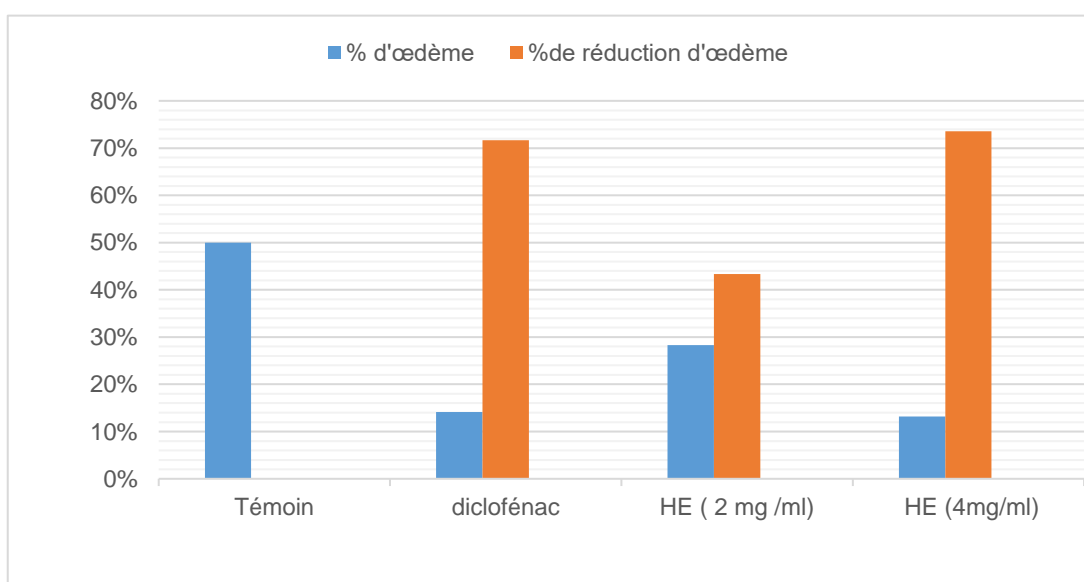


Figure 10 : pourcentage d'augmentation et de réduction de l'œdème provoqué par la caraghénine.

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

D'après la figure 10, nous constatons que l'huile essentielle de l'*O. floribundum* aux différents doses 2mg/ml, 4mg/ml a réduit l'œdème avec des pourcentages respectifs de 43,34 % et 73,58 %. La dose 4 mg/ml semble être la plus efficace, et supérieur au témoin positif (T+) qui présente un effet de réduction de l'œdème avec 71,68 %.

L'œdème due à la carraghénine, ou autres agents phlogistiques est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'étude des potentialités anti-inflammatoire des substances actives (**Okokon et al, 2006 ; Akindel et Adeymie, 2007 ; Chouhan et al, 2012**). Les animaux ont été privé d'eau pendant la période d'expérimentation pour ne pas influencer la réaction œdémateuse. La carragénine a provoqué un œdème visible juste après son injection et atteint son maximum à la quatrième heure, ce qui est en accord avec les travaux réalisés par (**Shreedhara et al, 2009 ; Devi et Mira, 2010 ; Chouhan et al, 2012**).

Le diclofénac, utilisé dans cette étude comme substance anti-inflammatoire de référence, se caractérise par une demi-vie plasmatique de 2 heures et un intervalle d'absorption de 2 à 3 heures après son administration orale (**Jacqz-aigrain et Guillonueau, 1998**).

Selon Raynaud, (2006) les huiles essentielles à alcool mono-terpéniques (le bornéol, le linalol, l'alpha-terpinéol...) ont une bonne activité anti-inflammatoire. D'après les résultats obtenus, nous avons déduit que l'huile essentielle de l'*Origanum floribundum* a un effet anti-inflammatoire.

7. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de l'HE de l'*Origanum floribundum*, effectuée par 2 méthodes différentes (aromatogramme et micro-atmosphère), a été testée sur 8 souches. Les résultats sont consignés dans le **Tableau 8**.

Pour le test micro-atmosphère, des quantités croissantes en HE ont été utilisées pour apprécier l'action « Dose-Dépendance » de l'HE de l'Origan.

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

Tableau 8 : résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE de l'Origan

Méthode utilisée						
Aromatogramme (DZI, mm)			Micro-atmosphère (DZI, mm)			
Quantité d'Huile essentielle (µl/disque)						
Souches microbiennes	Gram	HE	Réf	20	40	60
Souches bactériennes			GEN			
<i>Bacillus subtilis</i>	+	27	44	31	/	/
<i>Escherichia coli</i>	-	42	16	59	60	70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	16	27	25	48	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	13	26	57	49	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	13	27	27	44	/
Souches fongiques			FLC			
<i>Candida albicans</i>	Levure	20	15	36	50	67
<i>Aspergillus braziliensis</i>	Champignon	87	-	/	/	/
<i>Aspergillus flavus</i>	Champignon	/	-	44	/	/

(/) aucune zone d'inhibition, DZI : Diamètre de la zone d'inhibition, + Positif, - Négatif, Réf : Référence, GEN : Gentamycine, FLC : Fluconazol

➤ Résultats de l'aromatogramme

L'HE de l'Origan a présenté, in vitro une bonne activité inhibitrice sur la croissance de plusieurs souches bactériennes notamment sur les bactéries où les DZI obtenus oscillent entre 16 mm et 42 pour les disques imbibés dans l'HE (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*).

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

Et on remarque que toutes les souches bactériennes sont apparues sensibles face au l'antibiotique de référence (Gentamycine) avec des ZI supérieur à celui de l'HE sauf pour la bactérie *Escherichia coli* où la ZI de l'HE (42 mm) est supérieur à celle de l'antibiotique avec une ZI (16 mm).

Les résultats obtenus montrent que l'HE d'*Origanum floribundum* a une activité antimicrobienne importante vis-à-vis des souches testées. Parmi les bactéries Gram +, c'est *Bacillus subtilis* a été inhibée par l'HE étudiée avec 27 mm, suivi de *Staphylococcus aureus* avec 13 mm qu'est une bactérie pathogène pour l'homme. Elle est à l'origine de dangereuses intoxications alimentaires.

Dans le cas des bactéries Gram -, nous remarquons que l'HE a inhibé fortement la croissance d'*Escherichia coli* (42mm), puis *pseudomonas aeroginosa* (16 mm) et *Klebsiella pneumoniae* (13mm).

Certaines auteurs ont signalé que les bactéries Gram – se sont révélées plus résistants aux HE que les bactéries Gram + (**Bilerbeck et al., 2002 ; Sivropoulou et al., 1995**).

D'autres auteurs ont montré que les bactéries Gram – sont généralement les plus sensible à l'action des HE que les bactéries Gram + (**Haddouchi et al., 2008 ; Zaika, 1988**).

La résistance des bactéries Gram – à l'action des HE serait due à la présence d'une seconde membrane qui est composé de Lipopolysaccharides (LPS), forment une barrière vis-à-vis des HE ayant un caractère hydrophobe (**Prescott, 2003**).

D'autres auteurs ne trouvent pas de différence significative entre la sensibilité des bactéries Gram – et celle des bactéries Gram + (**Deans et al.,1987 ; Belgin et al., 2009**) comme ce fut le cas des résultats obtenus. Les différentes bactéries Gram + et Gram – testées manifestent une action variable à l'égard des HE employées puisque *Escherichia coli* (Gram-) a montré une grande sensibilité par rapport à celle de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* qui sont des bactéries Gram+.

Plusieurs chercheurs ont prouvé que ce sont les composés phénoliques qui confèrent aux HE une forte activité antimicrobienne, comme le thymol, le carvacrol methyl-ether et leurs

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

précurseurs bioénergiques qui sont γ terpinène et p-cymène (**Bendahou et al, 2007**), (**Belgin et al, 2009**).

En ce qui concerne l'activité antifongique, c'est *Aspergillus flavus* qui a montré la plus forte sensibilité vis-à-vis de l'HE avec une inhibition totale supérieure à *Aspergillus braziliensis* mais avec une forte inhibition de DZI (87 mm), puis *Candida albicans* avec un halo d'inhibition de 20 mm.

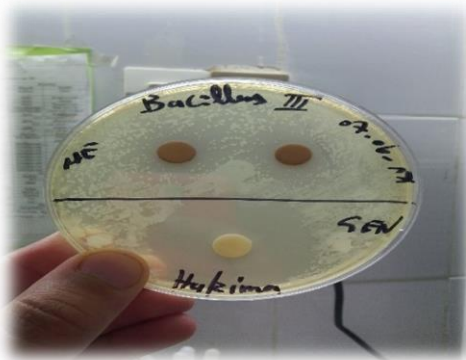
Et on remarque que les souches fongiques *Aspergillus flavus* et *Aspergillus braziliensis* sont apparues résistants face au l'antibiotique de référence (Fluconazol) mais pour la levure *Candida albicans* on observe qu'elle est sensible face au l'antibiotique par une ZI (15 mm) mais reste inférieur à celle de l'HE avec une ZI (20 mm).

Ces résultats montrent aussi que l'HE de l'Origan possède une très forte activité antifongique contre *Aspergillus braziliensis*, *Aspergillus flavus* et *Candida albicans*.

Cette action antifongique des HE est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivi d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (**Mann et al., 2000**). En effet, les composés terpéniques des HE et plus précisément leurs groupements fonctionnels réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures (**Giordani et Kaloustiane, 2006**). Aussi d'après **Goetz (2012)**, une très grande variété d'HE est connue pour exercer des propriétés antimicrobiennes et dans la plupart des cas, cette activité est due à la présence de constitués actifs représentés principalement par des mono terpènes, sesquiterpènes, des alcools, et autres hydrocarbures de phénols et qui sont présents dans la composition chimique de notre plante.

Une étude **Hhyldgaard et al., (2012)** fait apparaitre que les essences aromatiques riches en composés oxygénés sont dotées d'un fort pouvoir antimicrobien.

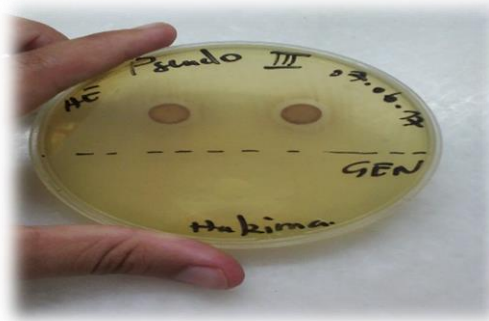
Chapitre 3 : Résultats et Discussion



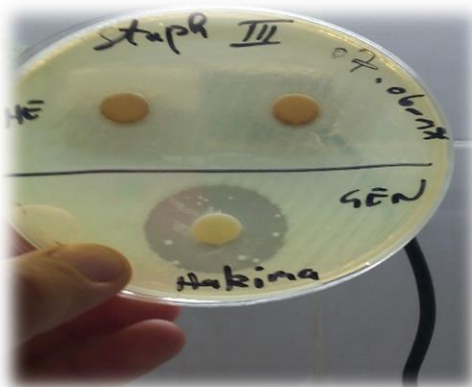
Bacillus subtilis



Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa



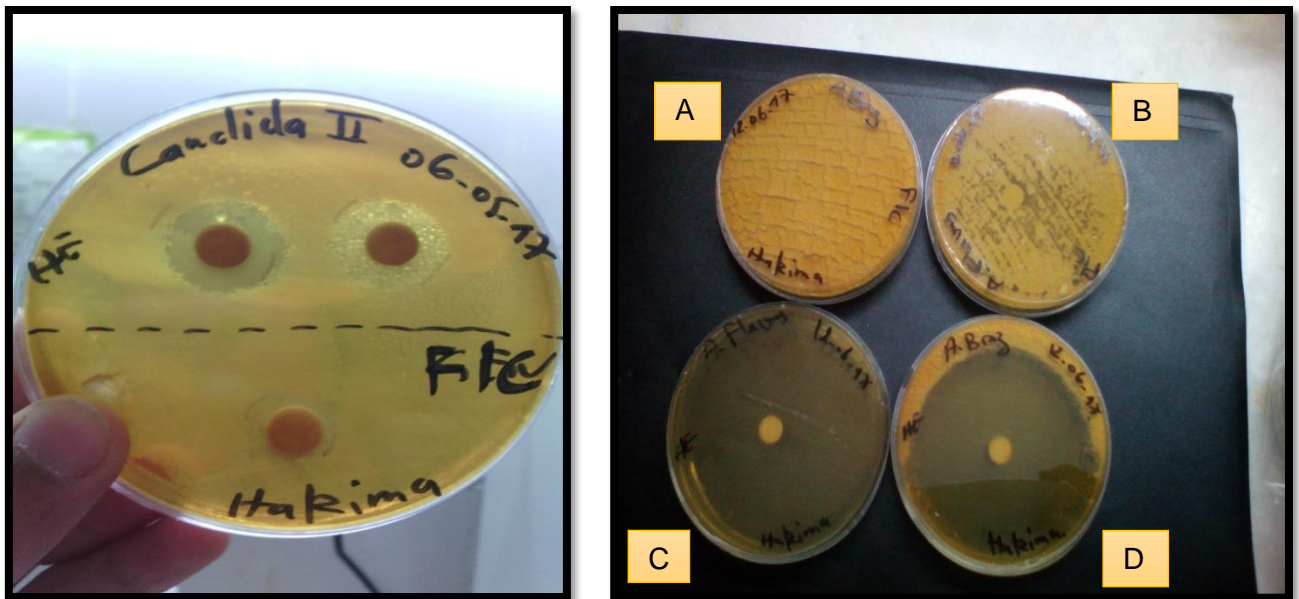
Staphylococcus aureus



Klebsiella pneumoniae

Figure 11 : résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de l'aromatogramme

(Original, 2017)



Candida albicans

A : *Aspergillus brazilliensis* avec fluconazol

B : *Aspergillus flavus* avec fluconazol

C : *Aspergillus flavus* avec l'HE

D : *Aspergillus brazilliensis* avec l'HE

Figure 12 : Résultats de l'activité antifongique par la méthode de l'aromatogramme

(Original, 2017)

➤ Résultats de la micro-atmosphère

Un screening antibactérien de l'HE de l'*Origanum floribundum* a été réalisé en micro atmosphère pour apprécier l'efficacité inhibitrice de l'essence en phase vapeur. Les résultats de ce screening sont colligés dans le tableau 9. En concordance avec les résultats obtenus en aromagramme, la phase vapeur de l'essence a exhibé une action inhibitrice sur la croissance de presque toutes les souches et notamment pour l'espèce *Escherichia coli* avec une DZI de 59 mm et une inhibition totale pour l'espèce *Aspergillus brazilliensis* pour la faible dose (20µL) et aussi une inhibition totale pour presque toutes les souches microbiennes testés pour la dose (60µl). Une action « dose-dépendance » (figure 13, 14, 15) a été aussi notée pour toutes les souches testées.

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

L'activité antimicrobienne des HE est principalement en fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Caillet et Lacroix, 2007**).

Le pouvoir antimicrobien des HE est en relation directe avec plusieurs paramètres à savoir :

- La nature des composés majoritaires
- Concentration de ces composés
- Nature et structure des groupements fonctionnels
- L'interaction probable entre les différents constituants (synergie) (**Ousalah *et al.*, 2007**).

Chapitre 3 : Résultats et Discussion



La souche bactérienne *Escherichia coli*



La souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*



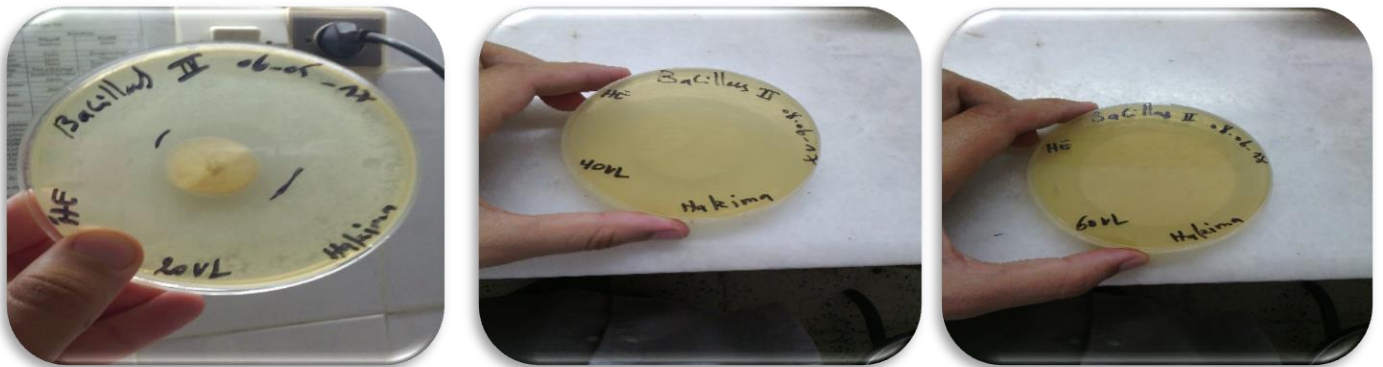
La souche bactérienne *Klebsiella pneumoniae*

Figure 13 : pouvoir antibactérien de la phase vapeur de l'HE de l'*Origanum floribundum*
sur les bactéries Gram- (Original, 2017)

Chapitre 3 : Résultats et Discussion



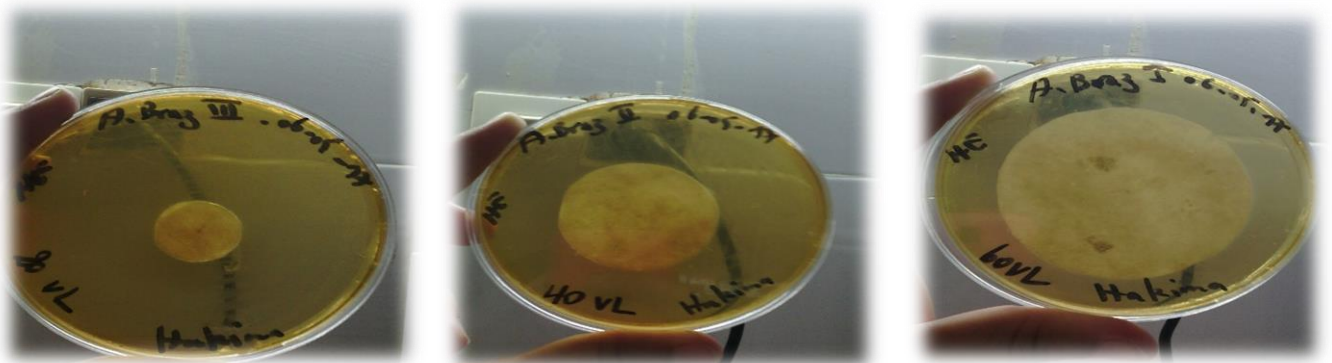
la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*



la souche bactérienne *Bacillus subtilis*

Figure 14 : pouvoir antibactérien de la phase vapeur de l'HE de l'*Origanum floribundum* sur les bactéries Gram+ (Original, 2017)

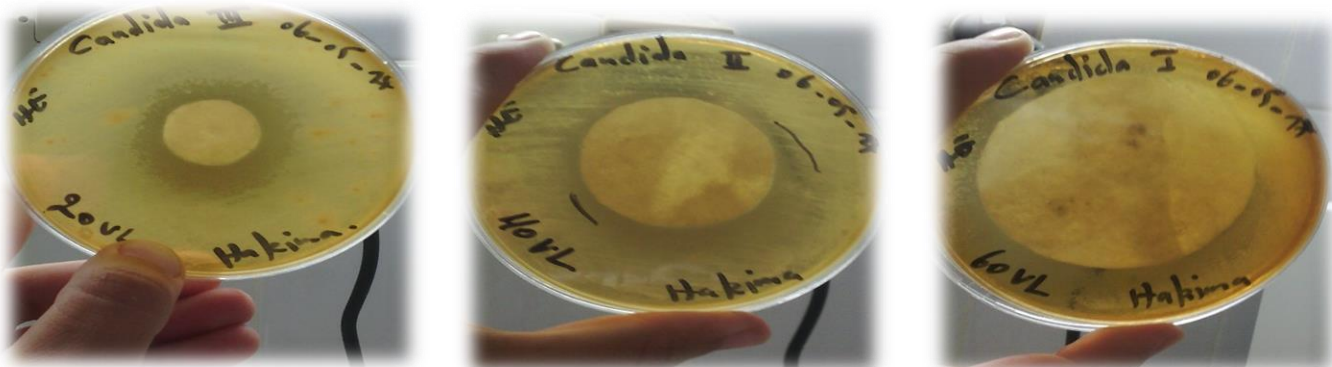
Chapitre 3 : Résultats et Discussion



La souche fongique *Aspergillus braziliensis*



La souche fongique *Aspergillus flavus*



La souche fongique *Candida albicans*

Figure 15 : pouvoir antifongique de la phase vapeur de l'HE de l'*Origanum floribundum*

(Original, 2017)

Conclusion

Conclusion

Dans le cadre de la valorisation des espèces végétales algériennes à caractères thérapeutiques, nous sommes intéressées à l'étude de l'Origan « *Origanum floribundum* » très répandue et espèce endémique de l'Algérie.

A la lumière des résultats obtenues, le screening phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de mettre en évidence des tanins, des alcaloïdes, des flavonoïdes, des glucosides, des anthocyanes, des leuco-anthocyanes, des saponosides, des terpènes et des coumarines. Ces métabolites secondaires sont connus par leurs larges effets pharmacologiques. La qualité de l'huile essentielle a été évaluée par la détermination des indices physico-chimiques : indice d'acide, indice de saponification, indice d'ester, indice de réfraction, pouvoir rotatoire. Ces résultats montrent que cette dernière préserve ses propriétés physico-chimiques et reflètent sa bonne qualité.

En outre, l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'Origan évaluée par deux méthodes, diffusion sur gélose et micro-atmosphère a révélé que l'huile essentielle est très active contre les souches bactériennes *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et les souches fongiques *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus flavus*, et *Candida albicans*.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire, nous a mené à déduire que l'huile essentielle de l'Origan est très efficace contre les inflammations causées par la caraghénine.

De même, l'HE de l'Origan possède une activité antioxydante importante, elle présente, en effet, une inhibition significative des radicaux libres.

En conclusion, nous pouvons dire que, le présent travail peut être considéré comme une source d'information sur les propriétés physico-chimiques, antibactérienne, anti-inflammatoire et antioxydante de l'huile essentielle de l'*Origanum floribundum*, cette plante locale est une source inestimable en divers composés doués des activités biologiques, ce qui témoigne et justifie son utilisation en médecine traditionnelle comme traitement à plusieurs pathologies.

Références bibliographiques

-A-

- Ait Youssef M., plantes médicinales de Kabylie, Ibis press, Paris, 2006, P177-179, P246.
- Abdullah Ijaz H, 2009, caractérisation and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae.
- Anonyme, (AFNOR, Association française de Normalisation), « Huiles essentielles, Tome 2, Monographies relatives aux huiles essentielles », Paris, (2000), P323.
- Akindel A. J. , Adeyemi, O.O. (2007). Anti-inflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrosocar puscocneus*. *Filotropia* .Vol. 78, 25-28pp.

-B-

- Bouhdid, S., Skali, S.N., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Amensour, M. and Abrini, J., « Antibacterial and antioxydant activities of *Origanum compactum* essential oil », *African journal of biotechnologie*, (16 May 2008), vol 7 (10), PP1563-1570.
- Baser, K.H.C., kurkçuoğlu, M., Houmani, Z and Abdel, L., « composition of the essential oil of *Origanum floribundum* Munby from Algeria », *journal of essential oil research*, (2000), 12, PP 753-756.
- Belaiche, 1979 in Mme Bekhechi chahrazed et Mr Abdel DjamelEddine, les huiles essentielles, 2^{ème} réimpression, édition : 1.04.5145, office des publications universitaires : 07/2014, Dépôt légal 2010, P16.
- Belgin, cosg., Arzu, Turker., Arif Ipek. Gurbuz, Bilal and Neset, Arslau., « chemical composition and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand-Mazz) Ietswaart, an endemic species to Turkey », *molecules*, 2009, 14, PP1702-1712.
- Bendadou, M., Muselli, A, grignon Dubois, Bemardini, J.F, and coste. J., « Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf essential oil and extract obtained by microwave extraction comparaison with hidrostillation », *food chemistry*, 2007, 106, PP132-139.
- Bourgeois.L, « le grand livre des plantes aromatiques ». Édition Rustica, Paris, 2000, P191.
- Bouhdid, S. et al., « Thymus essential oil chemical composition and in vitro antioxydant and antibacterial activities », congrés international de biochimie, Agadir, Maroc, 2006, P09-12.

- Bruneton. J, pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales. 1^{ère} édition, 1991, P488.
- Bruneton. J, pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} édition Lavoisier, 1993, p 915.
- Bruneton. J, pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Edition Tec & Doc, 3^{ème} édition Lavoisier. Paris, 1999, P309-353, P480, P484-497, P585.
- Bruneton. J, pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 5^{ème} Edition, Mai 2016, P709, P719, P722-723, P725- 726, P916.
- Baba Aissa F., les plantes médicinales en Algérie, édition Bouchène et Addiwan, Alger, 1991, P181.
- Baba Aissa F., Encyclopédie des plantes utiles. Edition Elmarifa, Alger, 2011, P265, 266, P330.
- Baalioumer A., 1987, Thèse de doctorat d'Etat Es science université d'Alger USTHB.
- Bouquet M., 1971, Travaux et document de l'Orstom. Paris.
- Bilerbeck, V.G., Roques, C., Vanière, P. et Marquier, P., « Activitéantibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles », Revue Hygiènes, (2002), volume x, n°3, PP 248-251.

-C-

- Couplan François, les plantes et leurs noms (histoires insolites), édition Qua, 2012, P153.
- Chohan H.S., Sridevik., Singh N.K., Singh S.K., 2012, Anti-inflammatory activity of ethanol extract of vitex glabrata leaves. Pak. J. Pharm. Sci. vol. 25, P131-134.

-D-

- Deans, S.G et Ritchie, G., « Antibacterial properties of plant essential oils », journal of food Microbiology, 1978,5, P162-180.
- Devie P., Mirak., 2010, Study of antioxydant, anti-inflammatory and wound healing activity of extracts *Listea Glutinosa*. J. Pharm. Sci. vol.2, n°2, P15.
- Debuing, 1984 in Mme Bekhechi chahrazed et Mr Abdel DjamelEddine, les huiles essentielles, 2^{ème} réimpression, édition : 1.04.5145, office des publications universitaires : 07/2014, Dépôt légal 2010.
- Debuing Gérard et François Couplan, petit Larousse des plantes médicinales, édition Larousse, Paris, 2009, P07, P126.
- Debaisieux Francis et Jean-Marie Polese, les plantes médicinales secrets et remèdes d'autrefois, édition Debaisieux, Mars 2011, P03-04.
- Daniel.H. les huiles essentielles, l'aromathérapie, Quebecor 1999, P13-P20.

-E-

- Ela, M.A, Elschaer. N.S et Ghanem.N.B., « Antimicrobial evaluation and Chromatographic analysis of some essential and fixed oils », 1996, 51, P993-995.
- Elabed et N. Kambouche, les huiles essentielles, édition dar el Gharb, 2003, P120.

-F-

- Fleurentin Jaques, les plantes qui nous soignent, tradition et thérapeutique, Tome 1, édition ouest. France, 1/12/2007, P163.
- Franchomme Pierre, la science des huiles essentielles médicinales, Guy Tré daniel éditeur, 19 rue saint-séverin 75005 Paris, P74-75, P279-282.
- Fiche technique ; 2008 : Huiles essentielle Origan vert, France Bio *Origanum vulgare. Hirticum*.

-G-

- Gerhard Ritcher, 1993, Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie, Lavoisier, P300.
- Gherib A, 1998, Travaux pratique de chimie thérapeutique.
- Giordani R. Kaloustian J, 2006, action anticandidosique des huiles essentielles leur utilisation concométante avec des médicaments antifongiques phytothérapie, 3,121-124.
- Goetz Paul & Gahedira Kamel, phytothérapie anti-infectieuse, édition spinger verlage France, Paris, 2012, P193-P327.
- Guide illustré de la flore Algérienne, 2009, Wilaya d'Alger-mairie de paris, avec le soutien du ministère des affaires étrangères et européennes de la république française, P67.

-H-

- Hajii, S., Beliveau, J., Simon, D. Acts colloq. Int.Plant. Aromat. Med, Maroc, 1985, P229-230.
- Hans W.Kothe, 1000 plantes aromatiques et médicinales, terres édition, Septembre, 2007, P10-11.
- Hazzit , M., Baalionamer, A., Lionor, M. et Falerio, M.Graa. Miguel., « composition of essential oils of Thymus and *Origanum spicies* from Algeria and their antioxydant and antimicrobial activities », Journal of Agricultural and food chemistry, 2006, 54 (17), 6314-6321.

- Houmani, Z., Azzoudj, S., Naxakis, G. and Melpomeni, Skoula., « the essential oil of composition of Algerian Zaatar, *Origanum spp* and *Thymus spp* », journal of herbs, spices & medicinal plants, 2002, volume 9. Issue 4. P275-280.
- Houmani Sellami, I., Maanouri.E, Chaled.T., Aidi wannes, W., Kchouk, M.E et Marzouk, B., « effet of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoran (*Origanum majorana L.*) », industrial gop and products, 2009, 30 ;P395-402.
- Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L., 2012. Essential oils in food preservation : mode of action, synergies, and interactios with food matrix componements front Microbiology, 3,12 doi : 10.3389/fmicb.2012. 00012.
- Haddouchi, F et Benmansour, A., « huiles essentielles, utilisation et activités biologiques, application à deux plantes aromatiques », les technologies de laboratoire, Janvier-Février, 2008, N°8, P20-27.
- Hugette Max, la route des épices (aromates, condiments et mélanges d'épices naturels, les carnets du gout, édition sang de la terre, 2002, P127-128.

-I-

- Iserin P., 2001. Encyclopedie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Larousse. Londres. P225.

-J-

- Jacqz – Aigrain E., Guilloneau M., 1998, Anti-inflammatoire Encyl Méd Chir (El sevier, Paris), Encyclopedie pratique de médecine. Vol.8, n°1010, P4.
- Jourdain Daniel, Dictionnaire des plantes médicinales, édition Quebecor, 2008, P136.

-K-

- Kokkini S., 1996. Oregano, Taxonomie, diversity and distribution of *Origanum Spicies*. Proceeding of the IPG RI International Work on Oregano, Italy, P1-13.
- Kimbaris, A.C., Siatis, N.G., Daferera, D.J., Tarantilis, P.A. Pappas, C.S., polission, M.G.Utrasonis Sonochem. 2006,13, P54-60.
- Keshavarz E., Baliuk L. Gerson D.et Ceschiuki M.J., 1996. « Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoires » Public Health Agency of Canada, 2^{ème} édition.
- Kango, C., Sawalihu, B E-H., Kone, S., Koukoua, G. et N'Guessan, Y T., « Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* », Compte Rendus Chimie, (2004), 7, PP1039-1042.
- Kpoviessi, D.S.S., Accrombessi, G.C., Kossouoch, C., Soumanou, M.M et Moudachirou, M., « propriétés physico-chimiques et composition de l'huile non

conventionnelle de poughère (*Jatropha curcas*) de différentes régions du Bénin », Comptes rendus chimie, (2004), 7, PP 1007-1012.

- Kim D.K. et al., 2003, Comprehensive study on vitamin C Equivalent Antioxydant Capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free Radical and its structural relation ship. Critical Reviews in food science and nutrition (44) : 253-273.

-L-

- Lifief Alix, guide pratique et conseils d'utilisation, édition Esi, 2016, P12-13.
- Luque de castro , M.D., Jiménez. Carmona, M.M et ferandez-précez, V. Trends Anal.chem ., 1999, 18, 708. In Ouis Naouel, Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de Fenouil et de Persil, Thèse de doctorat pour obtenir le Garde de docteur en sciences, Spécialité : Chimie.
- Loizzo, M.R. et al., « Chiminal analysis, antioxydant, anti-inflammatory and anticholinesterasse activities of *Origanum chrebergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oil », food chimistry, 2009, 117, P174-180.

-M-

- Maan C.M. Cox S.D., Markham J, L., 2000. The outer membrane of pseudomonas aeruginosa NCTC 6749 contributrs to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). Left. Appl. Microbiol., 30 : 249-297.
- Machu, 2008. *Origanum vulgare*, faculté libre des sciences et technologies. Polycopie : P5 in Merbah Daoudi.F. et Dahmani Megrrouche M., contribution à la caractérisation de la niche écologique d'espèce menacée : Elément pour sa conservation et sa valorisation, USTHB-FBS-4 the international congress of the populations & animal communautés « Dynamics & biodiversity of the terrestrial & aquatic Ecosystems » « CIPCAU » TAGHIT (Bechar)- Algeria, 19-21 Novembre, 2013,P282-283-284.
- Meena. M R. et Sethi. V, « Antimicrobial activity of the essential oil from spicies ». journal of food science and Technology Mysore, 1994, 31, P68-70.
- Merbah Daoudi.F. et Dahmani Megrrouche M., contribution à la caractérisation de la niche écologique d'espèce menacée : Elément pour sa conservation et sa valorisation, USTHB-FBS-4 the international congress of the populations & animal communautés « Dynamics & biodiversity of the terrestrial & aquatic Ecosystems » « CIPCAU » TAGHIT (Bechar)- Algeria, 19-21 Novembre, 2013, P282-283-284.
- Mohammedi.Z., 2006. « Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoides de quelques plantes de la région de Tlemcen » ; thèse de magistère ; université Abou bakr belkaid-Tlemcen.

- Moyses, R.R., H., 1976. Précis de matières médicales : pharmacognosie générale, pharmacognosie spéciale : shizophytes (Bactéries) Actinomycétales, thallophytes, ptéridophyte, spermatophytes. Edition : Masson. Paris.
- Moreau, 1960 in Elkalamoni chaker, 2010, En vue de l'obtention du doctorat de l'université de Toulouse, Délivré par l'Institut National Polytechnique de Toulouse
Discipline ou spécialité : Sciences des Agrossources, Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, P11.

-O-

- Okokon J.E., Antia B.S., Ita B.N., 2006, Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of ethanolic extract of *Setaria Megaphyles* leaves in rodents. African journal of biomedical research. vol. 9 : P229-233.
- Oussalah, M. et al., « Inhibitory effects of selected and essential oils on the growth of four pathogenic bacteria. E. Coli O 157 : H7, *Salmonella thyphimurium* *staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* », food control, 2007, 18, P414-420.
- Ouis Naouel, 2015, thèse de doctorat pour obtenir le grade de docteur en sciences, spécialité chimie organique, étude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil, Université d'Oran 1.

-P-

- Pharmacopée européenne., 2001. Direction de la qualité du médicament du conseil d'Europe (DEQM), troisième addendum de la troisième édition, série des traités européens n°50, Strasbourg France.
- Pharmacopée européenne., 2002. 4^{ème} Ed. Conseil de l'Europe. Strasbourg. 2060 p.
- Pharmacopée européenne, 2004, 5^{ème} Ed. Conseil de l'Europe, Strasbourg., P681-682-683.
- Pharmacopée Européenne., 2005. Tome 1. Conseil de l'Europe. Strasbourg. 3343 p.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. et Klein, D.A., « Microbiologie », édition de Boeck & Larcier, s.a, 2003, Bruxelles, P1137.

-Q-

- Quezel P. et Santa S., 1962-1963, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris. C.N.R.S, vol. 2, P1170.

-R-

- Raynaud J, 2006. Prescription et conseil en aromathérapie. Tec & Doc. France, P6-10
- Roulier G., 2005, Fabuleuse Amazonie, ses plantes et ses huiles essentielles, édition : angles, P96.

-S-

- Sallé. Jan. Luc, les huiles essentielles, avec la publication de Jaques pelletier, édition frison-roche, Paris, Septembre 1991, P16-17-18-19-36.
- Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. and khosnoodi, M., « in vitro evaluation of antibacterial and antioxydant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora Boiss* », food control, 2007, 18, P800-805.
- Shreedhara C.S., Viadya V.P., Vagdevi H.M., Latha K.P., Muralikrishra K.S., krupanidhi A.M., 2009, Screening of *Bauhinia Purpurea Linn.* For analgesic and anti-inflammatory activities Indian J Pharmacol. Vol 41 : P75-79
- Sivropoulou, A., kokkini, S., Lanaras, T. et al « Antimicrobial activity of mint essential oil », Journal of Agricultural and food chemistry, (1995), 43, PP2384-2388.
- Spiridon, E.Kintzios., « Oregano : the genera *origanum* and *Lipia* (Medicinal and aromatic plants-industrial profiles» Taylor and Francis, London, 1990,P265.
- Stumpf ursula, « Reconnaître facilement les plantes médicinales », édition Française, Paris, première publication, 2012, Dépôt légal : mars 2013, P16.

-W-

- Walter S. Judd christopher S. CAMPBELLE, Elizabeth A. Kellogg peterstevens, Janvier 2002, botanique systématique (rue perspective phytogénétique) 1^{ère} édition-Paris, P383-384.
- Wang M.Li.J, Ranharajan M, Shao Y, Lavoie E.J, Huang T.C, Ho C.T., 1998. Antioxydant phenolic coumpound from sauge (*Salvia officinalis*). J Agricultural and food chemistry. 46 : 4869-4873.
- Winter., CA, Risley EA, Nuss GW., 1962. Carrageenan-induced oedema in the hind paw. Of rat as an assay for anti-inflammatory activity. Proc Soc. Exp. Biol. Ther.111: P544-547.

-Z-

- Zaika., L.L, « Spices and herbs- Their Antimicrobial Activity and its determination», Journal of food Safety, 1988, 9 (2), P97-118.

Annexe 1

Matériel non biologique

Tableau 9 : appareillage, verreries, réactifs et solution

Appareillage	Verreries et autres	Réactifs et solutions
-Clevenger	-Béchers	-Acide chlorhydrique
-Bec benzen	-Ballon (1000 ml)	-Acétate de plomb
-Balance de précision	-Fioles (50-125-1000 ml)	-Alcool isoamylique
-Bain marie	-Boîtes de pétrie	-Acide sulfurique
- Etuve d'incubation	-Coton	-Diethyl éther
-Plaque chauffante	-Disque en papier	-Phénophtaléine
-Vortex	-Ecouvillons	-Hydroxyde de potassium
-Réfrigérant	-Entonnoir	-L'eau distillé
-Spectromètre de masse	-Eprouvette	-l'eau physiologique
UV-VIS	-Fioles	-Carragénine à 1 %
-Hotte	-Flacon en verre fumé et hermétique	-Réactif de dragendroff
-Ciseau	-Gants	-Ethanol
-Agitateur	-Micropipette automatique	-Méthanol
-Chauffe ballon	- Papier aluminium	-Tween 80
-Système de refroidissement	- Papier filtre	-Diclfénac
-Ampoule à décanter	-Pince stérile	-DPPH*
-Réfractomètre	-Pipette pasteur	-Gentamycine
-Polarimètre	-Pipette gradué	-Floconazol
	-Seringues	
	-Sonde de gavage	
	-Tubes à essai	
	-Réfrigérant	
	-Barreau magnétique	
	-Billes de verre	
	-Disques d'antibiogramme stériles (9mm)	
	-Portoir	

Annexe 2

Screening phytochimique



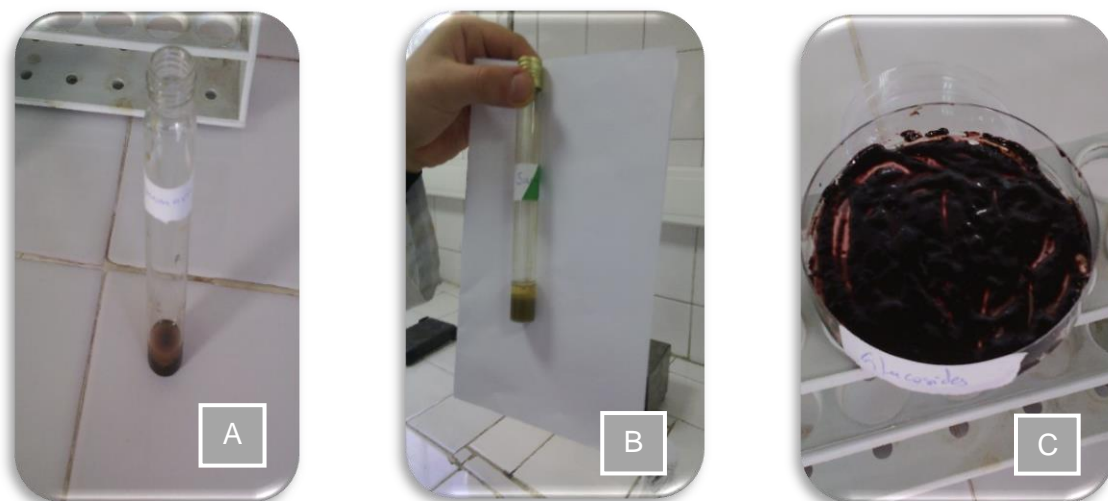
Figure 16 : Echantillon du l'Herbier de l'*Origan* de l'ENSA



Figure 17 : la plante sèche



Figure 18 : préparation de l'infusé



A : Coumarines, B : Saponosides, C : Glucosides



Figure 19 : identification de quelques composés chimiques (Original, 2017)

Annexe 3

Indices physico-chimiques



Figure 20 : Polarimètre de l'intérieur et de l'extérieur (Original, 2017)



Figure 21 : réfractomètre (Original, 2017)



Figure 22 : dispositif de l'indice de Saponification (Original, 2017)

Annexe 4



Figure 23 : vortex (Original, 2017)



figure 24 : Agitateur (Original, 2017)



Figure 25 : Etuve de paille (Original, 2017)



Figure 26 : balance analytique (Originale, 2017)



figure 27 : Dessiccateur (Original, 2017)

Annexe 5

L'activité antioxydante



Figure 28 : spectromètre (Original, 2017)



figure 29 : les deux cuvettes de spectromètre (Original, 2017)



Figure 30 : résultats de l'activité antioxydante (Original, 2017)



figure 31 : la solution de DPPH* (Original, 2017)

Annexe 6

Activité anti-inflammatoire

Préparation des dilutions de l'HE

Dans des fioles, ajouter à 10 ml de l'eau distillé : 20 mg et 40 mg de l'huile essentielle de l'*Origanum floribundum* et quelques gouttes de tween 80.

Préparation de la solution témoin :

Dans un Erlenmeyer de 250 ml, dissoudre un comprimé de Diclofénac 62,5 mg/kg dans 3 ml de l'eau distillée.

Agiter jusqu'à dissolution complète du comprimé.

Préparation de la solution de la carraghénine 1% :

Peser 1g de la carraghénine, dissoudre dans un 100 ml de l'eau distillé.

Tableau 10 : Evolution moyenne de poids des pattes postérieures, gauches et droite des souris de chaque lot, après injection de la carraghénine.

Lots	Lot témoin		Lot référence (Diclofénac)		Lot d'essai 1 2 mg/ml		Lot d'essai 2 4mg/ml		
	Gauche	Droite	Gauche	Droite	Gauche	Droite	Gauche	Droite	
1	0,205	0,113	0,132	0,123	0,174	0,140	0,120	0,096	
2	0,147	0,104	0,115	0,108	0,114	0,108	0,121	0,115	
3	0,169	0,104	0,137	0,118	0,135	0,120	0,13	0,119	
4	0,124	0,098	0,140	0,114	0,190	0,135	0,112	0,099	
5	0,136	0,105	0,120	0,102	0,159	0,096	0,117	0,1	
Moyen	0,156	0,104	0,129	0,113	0,154	0,120	0,120	0,106	



Figure 32 : les différentes solutions administrées aux souris (Original, 2017)



Figure 33 : les pattes droites et gauches des souris (Original, 2017)

Annexe 7

L'activité antimicrobienne



Figure 34 : Etuve de stérilisation
(Original, 2017)



figure 35: Etuve d'incubation
(Original, 2017)

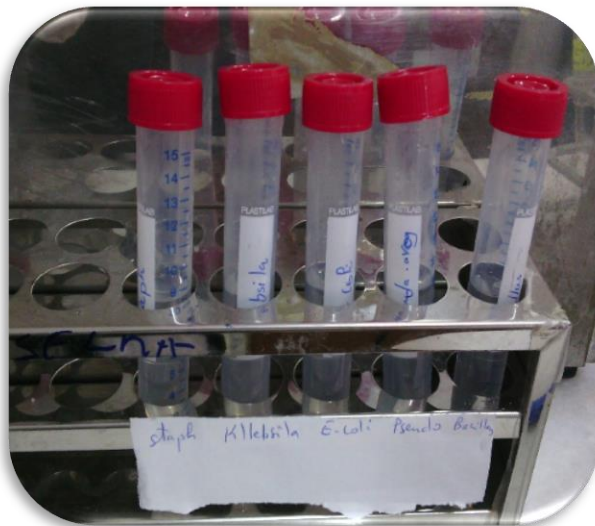


Figure 36 : Les suspensions bactériennes
(Original, 2017)



figure 37 : les suspensions fongiques
(Original, 2017)



Figure 38 : Les antibiotiques de Référence (Original,2017)



Figure 39 : les antibiotiques préparés en solutions (Original, 2017)

