

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA**

**Faculté des Sciences Agro-vétérinaires et Biologiques**

Département de Biologie

**MEMOIRE DE MAGISTER**

En Biologie

Spécialité : Biotechnologies Végétales

**EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES DE L'ORIGAN**

Par

**BOULAGHMEN Faïza**

Devant le jury composé de :

F. SAIDI	Professeur, U.S.D de Blida	Présidente
M.S. HAMAI	Maître de conférences A, U.S.D de Blida	Examineur
G. TAIL	Maître de conférences A, U.S.D de Blida	Examinatrice
M.S. ABDULHUSSAIN	Maître de conférences A, U.S.D de Blida	Promotrice
C. CHAOUIA	Maître de conférences B, U.S.D de Blida	Co-promotrice

Blida, Mai 2012

## RESUME

*Origanum floribundum* Munby est une plante endémique et rare d'Algérie, appelée communément Zaâter. L'espèce pousse spontanément dans les hautes montagnes de Hammam Melouane (Blida – Algérie).

L'étude de la plante porte sur l'extraction d'huile essentielle, caractérisation et analyse de ses activités antioxydantes, antimicrobienne et cicatrisante.

L'huile essentielle de la plante a été identifiée à 99,9% de ses composés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Elle est composée de 43 constituants dont Thymol à 38,3% représentant son chémotype suivi du p-Cymène et  $\gamma$ Terpinène à 24,4% puis du Carvacrol méthyl ether à 3,5%, du Carvacrol à 1,8% et du  $\beta$ -Myrcène à 1,5%.

Les sites de sécrétion et de stockage des huiles essentielles sont localisés au niveau des organes de la partie aérienne de la plante (tiges, feuilles et fleurs).

L'étude de l'activité antioxydante a révélé que l'huile essentielle d'origan possède un bon pouvoir antioxydant comparé aux témoins Butyl Hydroxy Toluène (BHT), Tocophérol et Acide ascorbique.

L'activité antimicrobienne a montré que l'huile essentielle possède un spectre antimicrobien considérable contre toutes les bactéries et levures testées.

La pommade dermique préparée à base d'huile essentielle s'est avérée non irritante et elle est dotée d'un pouvoir cicatrisant à partir de la concentration 1% comparée à un médicament de référence *Centella asiatica* appelé Madécasol®.

**Mots clés :** *Origanum floribundum*, huile essentielle, Thymol, antioxydante, antimicrobienne, pommade dermique, cicatrisante.

## SUMMARY

*Origanum floribundum* Munby is an endemic and rare plant in Algeria. The plant is called Zaâter, grows wild in the high mountains of Hammam Melouane (Blida – Algeria).

The study of the plant consist the extraction of essential oil, characterization and analysis of its antioxidant, antimicrobial and healing activities.

The essential oil of the plant was identified 99,9% of its compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), it is consists of 43 components including Thymol as chemotype representing 38,3%, followed by p-Cymene and  $\gamma$  Terpinene 24,4%, Carvacrol methyl ether 3,5%, Carvacrol 1,8% and  $\beta$  Myrcene 1,5%.

The sites of secretion and storage of essential oil are located in the organs of the aerial part of the plant (stems, leafs and flowers).

The study found that antioxidant essential oil of Oregano has a good antioxidant capacity compared with controls Butyl Hydroxyl Toluene (BHT), Tocopherol and ascorbic acid.

The study has shown that the antimicrobial essential oil has a significant antimicrobial spectrum against all tested bacteria and yeasts.

The skin cream prepared with essential oil is non-irritating, more than the other tested biological activity in vivo revealed that it has a healing power from 1% concentration compared to a reference drug called Madecazol® (*Centella asiatica*)

**Keywords:** *Origanum floribundum*, essential oil, Thymol, antioxidant, antimicrobial, healing skin cream.

## ملخص

نبات نادر و مستوطن بالجزائر , يطلق عليه *Omunagir floribundum*,  
ينمو هذا النبات بصفة برية بالجبال العالية في عدة مناطق ساحلية بالجزائر من بينها منطقة حمام ملوان  
(البليدة – الجزائر)  
تمثلت دراسة النبات في إستخراج الزيت الأساسية له, وصفها و تحليل وضايفها المضادة لأكسدة,  
للجراثيم و ألمضمة للجروح.

تمت معرفة الزيت الاساسية للنبات بقيمة 99,9 % من محتوياتها الكلية بواسطة تقنية كيميائية دقيقة  
و هي الكروماتوغرافية الغازية المقرونة بطيف الكتلة (CG/SM/), فالزيت الأساسية متكونة من 43 جزء, لقد تم  
التعرف على النوع الكيميائي ( chemotype ) للنبتة المدروسة بنسبة 38,8 % , إذ يمكن تصنيفها ضمن نباتات  
الزعر ذات الصفة الثيمولية (nagiro à Thymol), يتبعه p-Cymene و  $\gamma$ Terpinene بنسبة 24,4 % ,  
carvacrol ethylm ether بنسبة 3,5 % , كرفاكرول Carvacrol بنسبة 1,8 % و  $\beta$  Myrcene بنسبة  
1,5 %.

إن دراسة الأنسجة النباتية, ساعدتنا على تعيين مراكز خاصة لإفراز و تخزين الزيوت الأساسية  
الطيارة, التي تتموقع على سطح الأعضاء العلوية لهذه النبتة (السيقان, الأوراق و الأزهار).

إن دراسة التحاليل المضادة لأكسدة برهنت لنا أن الزيت الأساسية للنبات لها قدرة مضادة لأكسدة  
معتبرة و ذلك بعد مقارنتها بمواد اصطناعية معروفة شاهدة و هي بوتيل هيدروكسي تولوين (BHT), توكوفيرول  
(Tocopherol) و حمض الأسكوربيك (C) (vitamine).

أظهرت دراستنا حول حيوية الزيت الأساسية ضد الميكروبات, تبين أن لها مجال حيوي معتبر ضد  
البكتيريا و الفطريات المدروسة.

المرهم المحضر بزيت الأساسية  
برهن على أنه مصنف غير مهيج للبشرة, أما  
الإختبار الحي للنشاط البيولوجي للمرهم المنتوج بين أن له مفعول جيد لتضميد الجروح و ذلك إبتداءا من تركيز 1%  
مقارنة مع مرهم مرجعي *centella asiatica* المعروف بالماديسول.

الكلمات المفتاح : *Origanum floribundum* , الزيت الأساسية , ثيمول (Thymol),

مضاد لأكسدة , مضاد للجراثيم , مرهم جلدي , مضمد للجروح.

## DEDICACES

Je dédie ce travail à mes très chers parents, qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant toutes mes études, ma mère que j'aime plus que tout qui est toujours présente et attentive, je lui souhaite longue vie et à mon défunt père Allah yerahmou. Qu'ils trouvent ici une infime représentation de ma gratitude et ma reconnaissance.

A ma sœur adorée Farida, chez qui j'ai toujours trouvé la force d'aller vers l'avant.

A mes frères merveilleux Adlane et Sidahmed-Nabil pour leur disponibilité.

A mon mari attentif Abdnour, mes enfants que j'aime énormément Chahinez, Housseem et Manel, qui m'encouragent à tout instant.

A mon neveu que j'aime comme mon fils Abdelaziz.

A mes belles sœurs Samiia ; Faiza ; Bisma, beaux frères Abd-raouf ; Abdelghani, leurs conjoints Zoulikha ; Habiba ; Mohamed et leurs enfants Ferial, Roufaida, Madjid, Ilhem, Nihal, Mohamed rafieechane, sans oublier mes neveux adorables Boualem - Wassim, Mohamed - Rhiad et Rafik - Mounir.

A toute ma grande famille Boulaghmen, Kalache et Boudis.

A tous ceux et celles qui œuvrent de près ou de loin pour que brille la lumière du savoir.

**FAIZA**

## REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Mme Abdul Hussain pour m'avoir accordé sa confiance en acceptant de diriger ce travail, ainsi que Mme Chaouia pour avoir si bien co-dirigé ce travail, qu'elles trouvent ici l'expression de ma grande considération.

Mes remerciements s'adressent au Professeur Saidi qui m'a fait l'honneur de présider ce jury et ses encouragements permanents. A Mr Hamaidi, Mme Tail et Mr Megatli qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie Mr Hazzit maître de conférences à l'ENSA El Harrach, pour son aide précieuse, sa disponibilité et ses conseils avisés et je remercie également Mr Foudil-cherif maître de conférences à l'USTHB Bab Ezzouar, qu'ils trouvent ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

De la même manière je remercie Mr Nouas directeur de Biotic-usine (SAIDAL) et Mr Firkioui directeur du CRD des unités de SAIDAL El Harrach, pour m'avoir accueilli, pour la confiance et l'aide qu'ils m'ont accordé.

Je remercie également Mme Nacer-bey responsable du laboratoire des huiles essentielles, Mme Recham, Mme Boukhari et Melle Akkache du laboratoire de microbiologie, Melle Djillani et Arselane du laboratoire de galénique, Mr Zahwani, Mme Azine et Mme Bouchène du laboratoire pharmaco-toxicologie, Mme kafi, Mlle Wissem et Mme Chekoufi du laboratoire de chimie analytique du

CRD SAIDAL EI-Harrach et Melle Bouhoune du laboratoire Biotic-usine de SAIDAL EI-Harrach. Je remercie infiniment Pr Abdellali du laboratoire annexe de l'hopital Parnet et Mme Benassel maitre assistante en biologie végétale à Blida.

Je tiens à exprimer mes reconnaissances à tous ceux qui m'ont encouragé et aidé de près ou de loin à la concrétisation et la réalisation de ce travail.

Je remercie également mes camarades de promotion de magister biotechnologies végétales surtout Nefissa, Hafidha, Sara, Latifa, Asmaa, Dalila, Sabrina, Nadjib, Fouzia, Fattouma, Souad, Zoulikha, Moufidha, Dalila, Sihem, mes enseignants et tout le personnel des laboratoires du département de biologie, pour la contribution qu'ils ont apportés à mon travail.

**FAIZA**

## TABLE DES MATIERES

RESUME

SUMMARY

ملخص

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1.1. Huiles essentielles.....	4
1.2. Monographie de l'Origan nommé <i>Origanum floribundum</i> Munby...	14
1.3. Oxydation et activité antioxydante.....	21
1.4. Activité antimicrobienne.....	25
1.5. Activité cicatrisante.....	30
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....	36
2.1. Matériel biologique utilisé.....	36
2.2. Méthode d'étude.....	39
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	68
3.1. Etude botanique de <i>Origanum floribundum</i> Munby.....	68
3.2. Extraction et rendement en huile essentielle d'Origan.....	80
3.3. Caractérisation d'huile essentielle.....	83
3.4. Evaluation de l'activité antioxydante d'HE d'Origan.....	90



3.5. Activité antimicrobienne d'HE d' <i>Origanum floribundum</i> .....	94
3.6. Préparation et contrôle physico-chimique de la pommade dermique.	108
3.7. Essais pharmaco-toxicologiques.....	111
CONCLUSION GENERALE.....	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	125
A. Liste des abréviations, symboles et conventions.	
B. Composition des milieux de culture utilisés.	
C. Appareillage utilisé et tests biologiques.	
D. Protocoles utilisés.	
E. Entretien des animaux de laboratoire testés.	
F. Tableaux illustrant quelques résultats.	
G. Résultats des activités biologiques testés.	
H. Etude statistique.	
I. Glossaire	

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1.1 : Aspect morphologique d' <i>Origanum floribundum</i> .....	15
Figure 1.2 : Répartition des taxons dans les pays méditerranéen.....	17
Figure 1.3 : Principaux composés monoterpéniques rencontrés chez <i>Origanum spp.</i> ..	19
Figure 1.4 : Coupe transversale de la feuille d' <i>Origanum heracleoticum</i> (G x 420).....	20
Figure 1.5 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.....	23
Figure 1.6 : Illustration de l'aromatogramme.....	28
Figure 1.7 : Illustration de la méthode des microatmosphères.....	28
Figure 1.8 : Structure schématique de la peau.....	31
Figure 1.9 : Mécanisme cellulaire et moléculaire de la cicatrisation.....	32
Figure 1.10 : Structure chimique de <i>Centella asiatica</i> (Madécassol®).....	33
Figure 2.1 : Localisation de la région d'étude.....	36
Figure 2.2 : Tiges prostrées d' <i>Origanum floribundum</i> .....	38
Figure 2.3 : Inflorescences d' <i>Origanum floribudum</i> .....	38
Figure 2.4 : Réaction du radical DPPH avec un antioxydant AH.....	47
Figure 2.5 : Procédé de la mise en œuvre du test du pouvoir réducteur.....	49
Figure 2.6 : Principe simplifié de la méthode des aromagrammes.....	50
Figure 2.7 : Protocole d'analyse de la qualité microbienne.....	62
Figure 2.8 : Préparation de l'animal (le rat).....	65
Figure 3.1 : Inflorescences réunies en corymbe.....	69
Figure 3.2 : Présence de trichomes et poils tecteurs au niveau du périanthe (Gx4,5)..	69
Figure 3.3 : Disposition des étamines (G x 4,5).....	69

Figure 3.4 : Etamine (G x 10).....	69
Figure 3.5 : Présence de trichomes au niveau du carpelle observés à la loupe (G x 4,5 et x10).....	70
Figure 3.6 : Akène tapissé de poils tecteurs et trichomes (G x 10).....	70
Figure 3.7 : Présence des trichomes et poils tecteurs sur la face supérieure de la feuille observés à la loupe (G x 2,5 et 4,5).....	70
Figure 3.8 : Présence des trichomes et tecteurs sur la face inférieure de la feuille observés à la loupe (G x 2,5 et 4,5).....	71
Figure 3.9 : Présence de poils tecteurs et peu de trichomes sur la tige observés à l'œil nu puis à la loupe (G x 2,5).....	71
Figure 3.10 : Coupe transversale (CT) de la tige d'Origan à main levée (G x100).....	73
Figure 3.11 : CT de la tige d'Origan à main levée (G x 200).....	74
Figure 3.12 : CT de la tige d'Origan à main levée représentant les trichomes(G x400)	74
Figure 3.13 : CT de la tige d'Origan au microtome (G x 100).....	75
Figure 3.14 : CT de la tige d'Origan au microtome (G x 200).....	75
Figure 3.15 : C.T d'une feuille d'Origan à main levée (G x 100).....	76
Figure 3.16 : C.T d'une feuille d'Origan à main levée (G x 200).....	77
Figure 3.17 : C.T d'une feuille d'Origan à main levée montrant le trichome (G x 400).	77
Figure 3.18 : C.T d'une feuille d'Origan au microtome (G x 100).....	78
Figure 3.19 : C.T d'une feuille d'Origan au microtome (G x 200).....	78
Figure 3.20 : C.T d'une feuille d'Origan au microtome (G x 200).....	79
Figure 3.21 : C.T au niveau de la base de la feuille d'Origan au microtome (G x 100).	79
Figure 3.22 : C.T d'un pétiole d'Origan au microtome (G x 100).....	79
Figure 3.23 : Coupe longitudinale de la feuille d'Origan au microtome montrant un trichome glandulaire vu de face (G x 200).....	80

Figure 3.24 : C.T de la feuille d'Origan au microtome montrant un trichome glandulaire (G x 200).....	80
Figure 3.25 : Cinétique d'extraction de l'HE d' <i>Origanum floribundum</i> .....	82
Figure 3.26 : Chromatogramme CG/SM de l'HE de l'Origan de Hammam Melouane..	85
Figure 3.27 : Différents constituants d' <i>Origanum floribundum</i> .....	88
Figure 3.28 : Principaux constituants majoritaires d'Origan .....	88
Figure 3.29 : Secteurs de différentes classes chimiques d'Origan.....	88
Figure 3.30 : Représentation graphique du pouvoir d'inhibition du radical DPPH.....	91
Figure 3.31 : Test du pouvoir réducteur de l'HE d'Origan, Tocophérol, BHT et Acide ascorbique.....	93
Figure 3.32 : Activité antimicrobienne (étude qualitative) d'HE d' <i>Origanum floribundum</i> sur les différentes souches microbiennes.....	94
Figure 3.33 : Zones d'inhibition de l'HE d'Origan testée sur des bactéries Gram +....	96
Figure 3.34 : Zones d'inhibition de l'HE d'Origan testée sur des bactéries Gram -.....	97
Figure 3.35 : Zones d'inhibition de l'HE d'Origan testée sur des levures.....	97
Figure 3.36 : Détermination de CMI de l'HE d'Origan vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur MH à 1%, 0,5% et 0,25% (v/v).....	102
Figure 3.37 : Détermination des CMI de l'HE d'Origan vis-à-vis des souches bactériennes <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> et <i>Escherichia coli</i> .....	103
Figure 3.38 : Détermination des CMI de l'HE vis-à-vis des bactéries <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Micrococcus luteus</i> .....	103
Figure 3.39 : Détermination des CMI de l'HE vis-à-vis des levures <i>Candida albicans</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	104
Figure 3.40 : Détermination des CMB de l'HE d'Origan vis-à-vis des bactéries testées.....	105

Figure 3.41 : Détermination des CMF de l'HE d'Origan envers les levures testées.....	105
Figure 3.42 : Dénombrement des colonies obtenues de la souche <i>Candida albicans</i> après 48 h d'incubation et <i>Escherichia coli</i> après 24h d'incubation.....	107
Figure 3.43 : Pommade dermique à base d'HE d'Origan.....	108
Figure 3.44 : Observation de la pommade dermique au microscope photonique (MP) test d'homogénéité (G x 100).....	109
Figure 3.45 : Lapins témoins après scarification et sans traitement après 24 et 72 heures.....	111
Figure 3.46 : Lapins testés, après scarification et application de la pommade à base d'HE d' <i>Origanum floribundum</i> après 24 et 72 heures.....	111
Figure 3.47 : Evolution du processus de cicatrisation des plaies profondes circulaires	115
Figure 3.48 : Evolution de la surface de la plaie chez le rat, en fonction du temps.....	117
Figure 3.49 : Pourcentage des contractions des plaies chez le rat en fonction du temps.....	118
Figure 3.50 : Evaluation de la profondeur de la plaie chez le rat en fonction du temps.....	119
Tableau 1.1 : Systématique d' <i>Origanum floribundum</i> .....	14
Tableau 1.2 : Répartition géographique des deux espèces d'Origan en Algérie.....	17
Tableau 1.3 : Principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.....	22
Tableau 2.1 : Caractéristiques des souches microbiennes testées.....	51
Tableau 2.2 : Excipients de la pommade à base d'HE d' <i>Origanum floribundum</i> .....	57
Tableau 2.3 : Composition de la pommade dermique.....	57

Tableau 2.4 : Evaluation de la tolérance cutanée in vivo.....	64
Tableau 2.5 : Suivi du processus de cicatrisation.....	67
Tableau 3.1 : Taux d'humidité de la matière végétale.....	81
Tableau 3.2 : Caractères organoleptiques de l'HE d' <i>Origanum floribundum</i> .....	83
Tableau 3.3 : Caractères physico-chimiques de l'HE d' <i>Origanum floribundum</i> .....	83
Tableau 3.4 : Composition chimique de l'HE(%) d' <i>Origanum floribundum</i> .....	86
Tableau 3.5 : Comparaison entre les teneurs (%) des composés majoritaires des HE d' <i>Origanum floribundum</i> et <i>glandulosum</i> d'Algérie selon les régions et de Tunisie.....	89
Tableau 3.6 : Comparaison des zones d'inhibition (en mm) de l'échantillon étudié et les travaux de recherche.....	98
Tableau 3.7 : Les CMI et CMB/CMF (en %) d'HE d'Origan contre les différentes souches testées.....	102
Tableau 3.8 : Rapport CMB/CMI, CMF/CMI de d'HE d' <i>Origanum floribundum</i> utilisés vis-à- vis des souches bactériennes et des levures.....	106
Tableau 3.9 : Contrôle microbiologique des pommades dermiques.....	110
Tableau 3.10 : Evaluation de l'indice d'irritation cutanée primaire chez des lapins traités par la pommade d'HE d' <i>Origanum floribundum</i> .....	112
Tableau 3.11 : Evaluation des réactions cutanées.....	112
Tableau 3.12 : Evaluation des paramètres de cicatrisation chez le rat, pour chaque produit appliqué, en fonction du temps (jours).....	113



## INTRODUCTION

Les plantes utilisées par toutes les civilisations ont toujours apporté aide et réconfort aux maux les plus divers [1]. De nos jours l'association entre la chimie, la biochimie, la biologie, la médecine, la pharmacie et la botanique est un assemblage que personne ne peut contester. Les plantes identifiées et classifiées par les botanistes sont devenues la matière première de prédilection pour de nouvelles prospections pharmaceutiques.

Les problèmes de l'abus des antibiotiques présentent l'usage des huiles essentielles comme l'unique alternative de substitution dans la plupart des cas d'infection. Les huiles essentielles chémotypées (H.E.C.T), avec leur composition, leur nature et une posologie étudiée cliniquement, n'induisent pas de résistance des germes ni atteinte du système immunitaire ni même sélectivité des flores saprophytes et pathogènes [2].

La plupart des Lamiacées à huiles essentielles sont surtout connues pour leur intérêt dans diverses industries (parfumerie, liquoristerie, confiserie, produits cosmétiques, produits médicaux, agroalimentaire et vétérinaire) [3 ; 4].

Les huiles essentielles extraites de plantes médicinales ont montré que certaines d'entre elles pourraient combattre un facteur de vieillissement par la présence de radicaux libres dans la peau [5]. L'organisme aérobique produit quotidiennement des espèces oxygènes réactives (EOR) qui, en doses faibles jouent un rôle important dans l'entretien et le fonctionnement de l'organisme. Aux doses excessives, les EOR deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme causant ainsi, le stress oxydatif.

Les radicaux libres initient des réactions en cascade telle que la peroxydation lipidique, ce qui altère les lipides et protéines cellulaires provoquant vieillissement cellulaires, altération de l'ADN, cancer, maladies du cœur et



d'autres maladies dégénératives [6]. Les cellules de l'organisme réduisent les EOR par multiples enzymes comme protection endogène. La protection exogène est assurée par la consommation des antioxydants naturels extraits de fruits, légumes et plantes aromatiques [6].

La capacité antioxydante est explorée dans l'industrie agroalimentaire en utilisant les huiles essentielles pour la prévention du rancissement et oxydation des lipides. Cependant, de récentes recherches se sont orientées vers l'étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles naturelles qui remplaceraient les additifs synthétiques comme Butyl Hydroxy Anisol (BHA) et Butyl Hydroxy Toluène (BHT) qui s'avère être cancérigènes et toxiques. A cet effet, les huiles essentielles de l'origan comptent parmi les plus étudiées [7].

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 [8]. Il est représenté par deux espèces botaniques répandues en Algérie : *Origanum glandulosum* et *Origanum floribundum*.

Notre choix s'est porté sur une espèce d'Origan : *Origanum floribundum*, c'est une espèce endémique d'Algérie.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une meilleure connaissance de cette espèce du point de vue de sa composition chimique. Pour cela, nous avons étudié l'activité biologique par l'étude in vitro de l'activité antimicrobienne, antioxydante et cicatrisante.

La première partie de ce travail est consacrée à :

- Extraction de l'huile essentielle de la plante
- Evaluation du rendement de l'huile essentielle de l'Origan
- Etablissement de la cinétique d'extraction de l'huile
- Mesure du taux d'humidité de la plante
- Détermination des indices physico-chimiques de l'huile.

L'analyse qualitative et semi-quantitative d'huile essentielle de l'Origan a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse (CPG/SM).

Des tests biologiques de l'huile essentielle et leurs éventuelles activités ont été réalisés dans la seconde partie, parmi elles :

- L'activité antimicrobienne étudiée du point de vue qualitative par la détermination des zones d'inhibition et quantitative par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), bactéricides (CMB) pour les bactéries et fongicides (CMF).
- L'activité antioxydante est effectuée selon deux méthodes :
  - Pouvoir de piégeage du radical 2-2 Diphényl-1-picryl Hydrazyl (DPPH)
  - Pouvoir réducteur.
- L'activité cicatrisante est obtenue par la mise au point d'une formule galénique semi-solide, à usage topique (pommade dermique). Elle contient l'HE à des concentrations de 0.5, 1 et 2%, comparée au témoin de référence : *Centella asiatica* appelé le Madécasol ®. Ce test est réalisé sur des rats albinos type Wistar.

## **CHAPITRE 1**

### **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### 1.1. Huiles essentielles

##### 1.1.1. Historique

L'extraction des huiles essentielles commença environ 4000 à 5000 ans avant Jésus Christ en Orient. Les HE ont été utilisées d'abord en Chine, en Inde sous forme de massage puis en Irak et en Égypte sous forme d'embaumement des pharaons et conservation des aliments. En Grèce et à Rome, l'extraction des HE était très répandue pour combattre l'épidémie de peste [9 ; 10].

En Amérique, les civilisations Indiens, Aztèque, Maya et Inca connaissaient l'emploi des drogues végétales pour guérir les infections et les plaies. Au Moyen Orient, les Arabes et les Perses ont fait progresser considérablement l'aromathérapie par les travaux de Gerber ensuite Ibn Sina (Avicenne) 980-1037 qui produit la première huile essentielle pure en inventant le serpentin pour le refroidissement des vapeurs d'alambic [11].

Les principes de la distillation et techniques d'extraction arrivèrent en Europe au XIIIème siècle, par le biais des croisades musulmanes [12]. Au XXème siècle le chimiste français René Maurice Gattefossé a consacré une grande partie de sa vie à la recherche sur l'extraction et le mode d'action des HE [13]. Il existe actuellement environ 150 HE aux propriétés thérapeutiques établies [14].

##### 1.1.2. Répartition botanique des huiles essentielles

Parmi les 800.000 espèces du monde végétal, 10% seulement sont dites aromatiques et capables de synthétiser une essence [15].

Elles sont réparties dans un certain nombre de famille parmi elles : Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae et Piperaceae [3].

Les huiles essentielles peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux : sommités fleuries (Origan et Menthe), écorce (Cannelier), racines (Vétiver), rhizomes (Gingembre), fruits (Anis, Fenouil et Bardianier) et bois (Camphrier).

La teneur d'une drogue en huile essentielle est généralement faible, de l'ordre 1% à 1‰. Il existe cependant quelques plantes ayant une teneur en essence supérieure à 5% telle que la Badiane de Chine. Le Clou de Girofle, quand à lui, il renferme plus de 15% d'essence [16].

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices. Elles sont stockées dans des cellules transformées en cellules à essence, dans des poils glandulaires, des poches sécrétrices ou des canaux sécréteurs [17].

### 1.1.3. Composition de l'huile essentielle

En se référant à la norme française NF T 75-006 [18], l'HE est défini comme étant un produit de composition complexe renfermant des principes volatils, obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur ou par des procédés mécaniques (Pharmacopée Européenne, 2008) [19]. Le caractère volatil de l'HE lui confère un parfum souvent très odorant [20].

Les composants des HE sont génériquement dits « aromatiques » en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique, ce qui peut prêter à confusion.

A coté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), il existe des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces. Il existe certaines huiles dites mono, bi ou tri-moléculaires selon qu'elles sont constituées presque exclusivement d'une, de deux ou trois molécules majoritaires [21 ; 22].

Les molécules contenues dans les huiles essentielles, se présentent sous forme de plusieurs groupes :

#### 1.1.3.1. hydrocarbures

Au sein de ce groupe, il existe les hydrocarbures aromatiques, monoterpéniques ( $C_{10}H_{16}$ ), sesquiterpéniques ( $C_{15}H_{24}$ ) et plus rarement diterpéniques ( $C_{20}$ ).

#### 1.1.3.2. Composés oxygénés :

A l'intérieur de ce groupe, se trouve les alcools aliphatiques et cycliques, (saturés et insaturés), des éthers oxydes, des phénols, des lactones, des composés sulfurés. Il existe naturellement d'autres corps qui peuvent entrer en faibles proportions dans la constitution de certaines HE, notamment les acides organiques, les cétones, les coumarines volatiles et les flavonoïdes [23].

#### 1.1.4. Rôle des huiles essentielles

Actuellement, les chercheurs sont incapables de savoir l'action des huiles essentielles au sein de la plante. Plusieurs théories sont citées, pour la plupart d'entre eux, ce serait des déchets du métabolisme cellulaire de la plante. D'autres auteurs affirment, que les huiles essentielles serviraient à attirer les insectes, pour permettre la pollinisation ou bien à les éloigner afin de protéger la plante [24].

La présence des huiles essentielles dans les racines (Vétiver et Gingembre), les écorces (cannelle), le bois (Santal) correspond à un effet antiseptique vis-à-vis des parasites présents dans le sol ou attaquant le bois. Certains terpènes linéaires composants des HE interviennent dans le métabolisme de la plante, ils peuvent être employés comme source énergétique [25].

#### 1.1.5. Facteurs de variation de la composition chimique des huiles essentielles

La teneur et la composition chimique d'une huile essentielle varient en fonction d'un grand nombre de facteurs extrinsèques [26 ; 27] et intrinsèques, l'existence des chémotypes, l'influence du cycle végétatif et le procédé d'extraction contribuent dans cette variabilité.

Les chémotypes ou corps chimiques proviennent des variations de la concentration des molécules principales [28]. L'action du chémotype est influencée et complétée par des molécules secondaires. Cette synergie explique la polyvalence des HE et la largeur de leur spectre [29].

Au sein d'une même espèce de la plante, la composition de l'HE des divers individus peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents. L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris* présente dans le sud de la France. Il existe en effet six chémotypes différents pour cette seule espèce. Ces différences sont au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'HE qui peut être soit le géraniol, l' $\alpha$ -terpinéol, le thuyanol-4, le linalool, le carvacrol ou le thymol [30].

Ce polymorphisme chimique existe aussi pour d'autres espèces : comme *Origanum vulgare* [31] et *Mentha spicata* [32 ; 33].

#### 1.1.6. Conservation des huiles essentielles

Par nature, l'HE est très volatile, instable et très fragile, elle doit être conservée à l'abri de la lumière, chaleur et l'air car elle s'oxyde facilement. Elles se conservent dans un flacon propre et sec en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté antiactinique. Le flacon doit être presque entièrement rempli et fermé de façon étanche (l'espace libre étant occupé d'azote ou d'un autre gaz inerte) [3].

En général, le délai de conservation peut aller de 6 mois à 3 ans, selon la nature de l'HE et la qualité de conservation (règles d'emballage, de conditionnement et de stockage d'après AFNOR NFT 75-001, (2000) et règles de marquage de récipients d'après AFNOR NF T75-002 (2000) [18].

#### 1.1.7. Toxicité

Le caractère d'une huile essentielle correspond à celui de la plante dont elle est extraite. Sa toxicité est d'autant plus importante que sa concentration est forte. Des précautions doivent être prises avant tout emploi, concernant le dosage ainsi que le mode d'application interne ou externe [34].

##### 1.1.7.1. Toxicité selon la composition

Certains auteurs [35 ; 36] se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent. Une utilisation prolongée des huiles essentielles à thuyones (Thuya, Absinthe et Sauge officinale) est neurotoxique.

#### 1.1.7.2. Toxicité par ingestion

Les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible. La majorité de celles qui sont couramment utilisées ont une DL50 comprise entre 2 et 5g /kg (anis, eucalyptus et le girofle). D'autres espèces peuvent avoir une DL50 supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine et vétiver). Les autres HE ont une DL50 comprise entre 1 et 2 g/kg tels que le basilic, estragon et hysope. L'Origan et la sarriette présentent respectivement une DL50 de 1,5ml/kg et 1,37g/Kg.

Les HE les plus toxiques sont celles de boldo (*Peumus boldus* de la famille des Monimiaceae) avec 0,13g/kg. Les convulsions apparaissent dès 0,07g/kg, de chénopode avec 0,25g/kg, de thuya avec 0,83g/kg, de pennyroyal avec 0,4g/kg ainsi que l'essence de moutarde avec 0,34g/kg [3].

#### 1.1.7.3. Toxicité dermique

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) [37] ou phototoxique (huiles de citrus contenant des furocoumarines) [38].

#### 1.1.7.4. Toxicité sur cellules animales

La toxicité de l'HE de thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour l'HE de la lavande. Les deux HE sont cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois [39 ; 40].

#### 1.1.8. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Plusieurs méthodes d'extraction d'HE sont utilisées. L'extraction à la vapeur d'eau représente 80% de la récupération des huiles.

Les techniques les plus courantes sont :

##### 1.1.8.1. Hydrodistillation

Le principe de cette méthode consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un ballon ou alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes (eau + molécules aromatiques) sont condensées en passant dans un serpentín du réfrigérant et redeviennent liquide et

recueilli dans une ampoule à décanter ou au robinet dans un essencier (vase florentin). L'huile essentielle et l'hydrolat vont se séparer naturellement, l'HE reste en surface qui sera décantée puis filtrée [41].

#### 1.1.8.2. Entrainement à la vapeur d'eau

La vapeur d'eau traverse le matériel végétal, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle [42].

#### 1.1.8.3. Hydrodistillation par micro-ondes sous vide

La plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-ondes sous vide, l'HE est entraînée dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée. Très rapide et peu consommateur d'énergie [43].

#### 1.1.8.4. Extraction par solvants

Dans cette technique des solvants sont souvent utilisés pour extraire l'HE [44].

#### 1.1.8.6. Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique

A l'état gazeux, le CO<sub>2</sub> est capable de dissoudre les composés organiques. Cette propriété est employée pour extraire les HE, après évaporation du CO<sub>2</sub> [45].

#### 1.1.9. Analyse des huiles essentielles

Après extraction de l'HE, il est nécessaire de déterminer sa composition chimique ainsi que ses propriétés physico-chimiques. L'analyse chimique de l'HE est réalisée de manière qualitative par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et quantitative par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

Cependant les composés qui ne sont pas facilement séparés par CPG, ce sont des molécules de structure semblable comme les composés stéréoisomériques des HE qui seront analysés par la résonance magnétique nucléaire du carbone-13 (RMN) [46 ; 47 ; 48 ; 49 ; 50].

#### 1.1.10. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Les HE se retrouvent dans de nombreux secteurs notamment : les médicaments, les produits ménagers, jusqu'à la gastronomie en passant par le parfum et la cosmétique, de l'aseptisation aérienne aux soins [51].



#### 1.1.10.1. Pharmacie

Les HE sont utilisés en pharmacie pour l'aromatisation des formes orales comme celles de la menthe et citron. Les HE de la lavande et de la citronnelle sont utilisées pour le parfumage des préparations dermo-pharmaceutiques [52]. Les propriétés aromatiques et antiseptiques sont dues à la présence des composés terpènes phénoliques comme le thymol et le carvacrol [53 ; 54].

#### 1.1.10.2. Aromathérapie

Les HE d'Origan et de Thym ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoire. Leurs composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation.

Les huiles essentielles et leurs constituants volatils font actuellement l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux [55].

#### 1.1.10.3. Parfumerie et cosmétique

Les propriétés odoriférante, antiseptique et antioxydante des HE confèrent également à ces dernières une consommation importante en parfumerie et en cosmétique car elles permettent de préserver les produits comme les pommades, crèmes et gels, tout en leur assurant leur odeur agréable [56 ; 57].

#### 1.1.10.4. Industrie agroalimentaire

L'origan, le thym, la sauge, le romarin et les clous de girofle sont des plantes aromatiques fréquemment utilisés comme ingrédients alimentaires. Les HE de ces plantes ont toute une particularité commune, elles sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol, et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne et antioxydante Ils sont utilisés comme agents de conservation et aussi comme arôme alimentaire [58 ; 59].

#### 1.1.11. Marché des huiles essentielles

##### 1.1.11.1. Dans le monde

La base de données du World Trade Analyzer classe les parfums et les HE représentent la dixième industrie parmi les dix industries d'importation croissant le plus rapidement dans le monde.

Quatre pays dominent la scène internationale comme producteurs potentiels d'HE, le Brésil, l'Indonésie, la Chine et l'Inde. Cette dominance est due à leur population importante, à leur consommation interne accrue d'HE et à leurs investissements dans la formation scientifique et technique [60].

#### 1.1.11.2. En Algérie

Durant la période coloniale et après l'indépendance, l'Algérie comptait parmi les pays producteurs exportateurs des HE provenant soit des cultures familiales ou des plantes spontanées. Les plus répandues étaient la menthe, le jasmin, le rosier, le bigaradier, le géranium, la lavande, le romarin, l'origan, le thym et la sauge.

La dernière exportation était d'environ de 2 tonnes d'HE. La production est devenue quasiment inexistante. Actuellement la production d'HE est limitée à quelques producteurs privés artisanaux, qui ne subvient pas au marché national. De ce fait, l'Algérie a eu recours aux importations de cette matière pour couvrir les besoins sans cesse croissants du consommateur Algérien.

En 1999, les importations en HE ont atteint une quantité de 50 tonnes, d'une valeur estimée à 300.000\$ US. Cette dernière a franchit les 2 millions de \$ US en 2003, avec une quantité de plus de 200 tonnes d'HE [60].

## 1.2. Monographie de l'Origan : *Origanum floribundum* Munby

### 1.2.1. Historique

L'utilisation de l'Origan a été médicinale avant d'être culinaire. Les Grecs en utilisaient les feuilles pour soulager les muscles douloureux. Les Romains le prenaient pour soulager les morsures de serpents ou de scorpions. Aristote et Hippocrate recommandaient déjà l'Origan pour ses actions contre les maladies respiratoires, les brûlures et problèmes de digestion [61].

Le nom de l'origan est dérivé des mots grecs **Oros Ganos** qui veulent dire « ornement des montagnes » ou « joie des montagnes ». L'origan était autrefois également appelé herbe porte bonheur [62]. Les chinois l'utilisent depuis des siècles pour traiter la fièvre, la diarrhée, la jaunisse et les blessures [63 ; 64].

### 1.2.2. Taxonomie et classification de l'Origan

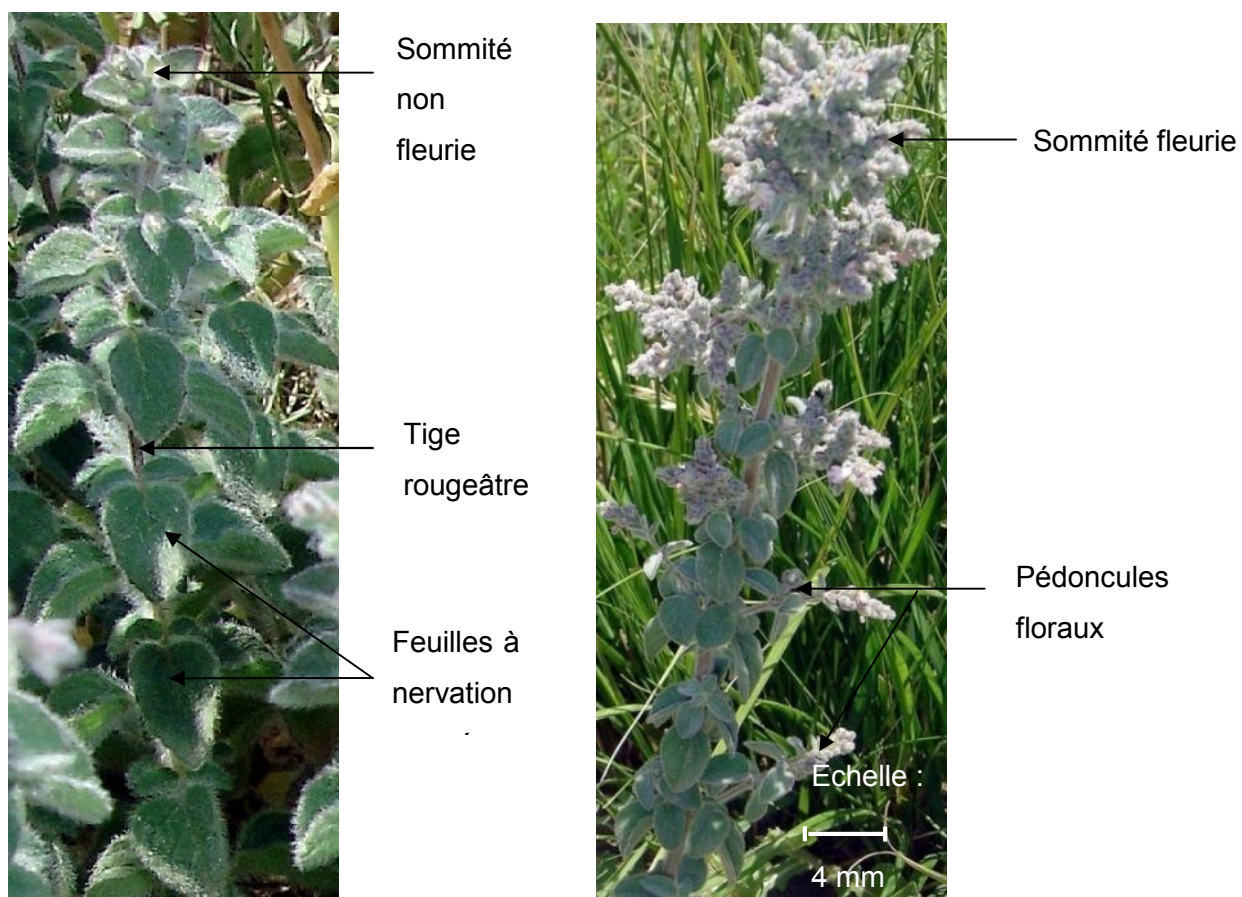
L'origan appartient à la grande famille des Lamiaceae de Dicotylédones Asteridae renfermant 251 genres regroupant 6700 espèces (Tableau 1.1). Le genre *Origanum* inclut des arbustes nains, des plantes annuelles, bisannuelles ou vivaces hermaphrodites qui se reproduisent dans les zones chaudes et montagneuses.

Tableau 1.1 : Systématique d'*Origanum floribundum* [65].

<b>Règne</b>	Plantae(végétal)
<b>Sous règne</b>	Tracheobionta (plantes vasculaires)
<b>Embranchement</b>	Spermatophyta
<b>Sous embranchement</b>	Angiospermae
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida (Dicotyledones)
<b>Sous classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiaceae (labiatae)
<b>Sous famille</b>	Nepeitodeae
<b>Genre</b>	<i>Origanum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Origanum floribundum</i>

### 1.2.3. Description de la plante étudiée

Le genre *Origanum* est constitué de plantes herbacées ou semi- ligneuses à la base. Il mesure de 25 à 85 cm de haut [66]. L'Origan a un aspect sec, d'un vert rougeâtre et totalement recouvert d'un duvet [67] (figure 1.1.a).



(a) Rameau de la plante *Origanum floribundum*

(b) Rameau fleuri

Figure 1.1 Aspect morphologique d'*Origanum floribundum* (a et b), (Original, 2009).

#### 1.2.3.1. Appareil végétatif

Les racines sont lignifiées, rampantes et ramifiées [17]. Elles atteignent des profondeurs variables, en fonction du sol [68]. Les tiges sont dressées rameuses [69], à section carré à arrêtes saillantes, de teinte rougeâtre et couvertes d'un léger duvet [70]. Les feuilles sont petites, ovales, opposées [4], pointues à l'extrémité, vertes sur les deux faces [71]. Les feuilles inférieures sont pétiolées et les feuilles supérieures sont presque sessiles [72].

### 1.2.3.2. Appareil reproducteur

Les inflorescences sont en épis, réunis eux même en inflorescences composées, entourées de bractées ovales imbriquées de couleur rouge violet [73] (figure 1.1.b). Le calice est tubuleux à 5 dents courtes, parfois bilabiées. La corolle est blanche ou rosée, à lèvre supérieure émarginée et à lèvre inférieure trilobée.

L'espèce *Origanum floribundum* a une corolle de couleur rose pourpre avec des lèvres sensiblement égales [74]. Les étamines sont en nombre de 4, elles sont exsertes, droites, écartés et divergentes. Les deux étamines inférieures sont un peu plus longues [75].

L'ovaire est supère, bicarpellaire et divisé en 2 loges comportant chacune 2 ovules [17]. La floraison s'effectue entre Juin et Août, chaque fleur produit à maturité 4 graines. Les sommités fleuries sont parsemées de petites glandes contenant les huiles essentielles qui donnent à la plante son arôme et saveur [76]. Le fruit est constitué de 4 akènes libres et lisses de teinte sombre contenus dans le calice devenu coriace [70].

### 1.2.4. Variabilité

Les botanistes ont identifiés dans le genre *Origanum*, 03 groupes, 10 sections, 43 espèces, 06 sous- espèces et 18 hybrides [77 ; 78]. Des membres du genre sont distribués principalement autour de la région Méditerranéenne [79], avec plus de 80% se produisant exclusivement dans l'Est de la Méditerranée [80].

### 1.2.5. Ecophysiologie

L'Origan pousse dans les lieux secs et ensoleillés y compris en montagne [81], jusqu'à 1500-2000m d'altitude [82]. L'Origan préfère les terrains fertiles et meubles à tendance calcaire. Il supporte très bien la sécheresse et le froid [83].

### 1.2.6. Répartition géographique

#### 1.2.6.1. Dans le monde

L'Origan pousse surtout dans les pays méditerranéens, ainsi que dans de nombreux pays d'Europe et d'Asie. Parmi les 49 taxons, 13 espèces sont classées comme rares dont *Origanum floribundum* d'Algérie (figure 1.2).

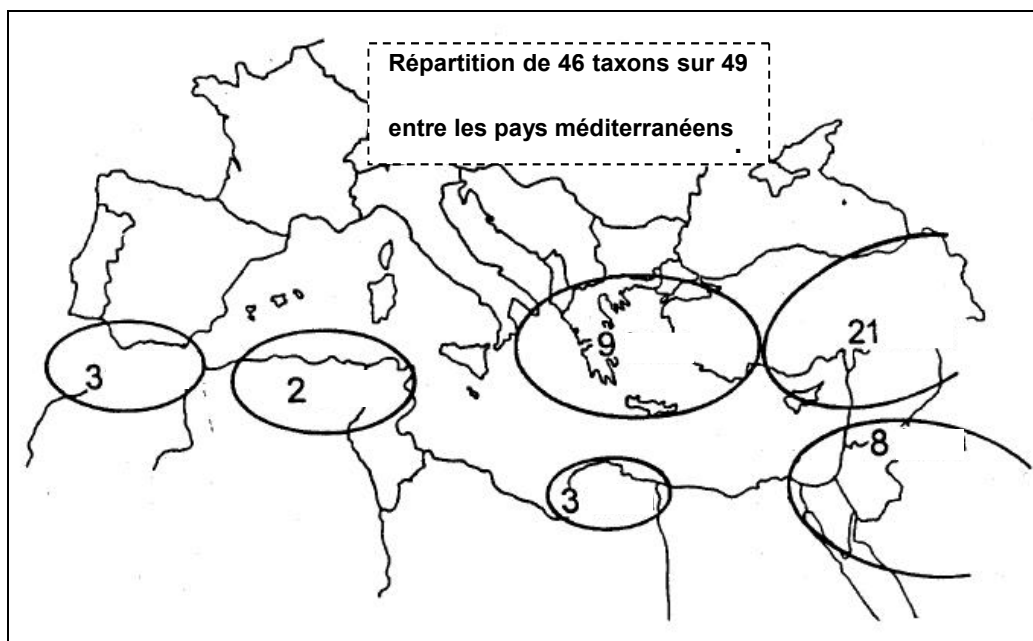


Figure 1.2 : Répartition des taxons d'origanum dans les pays méditerranéens [84].

#### 1.2.6.2. En Algérie

Le nom vernaculaire d'Origanum est zaâter (زعتر). Cette plante est représentée par deux espèces : *Origanum glandulosum* et *Origanum floribundum*. Cette dernière est d'ailleurs une espèce endémique Algérienne. Selon la classification du genre établie par Letswaart en 1980 [77], les 02 espèces appartiennent aux sections IX *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* et VIII *Elongastipica*, respectivement (Tableau 1.2).

Tableau 1.2: Répartition géographique des deux espèces d'origan en Algérie [23 ; 74]

Espèces	Section	Localisation et caractéristiques
<i>Origanum glandulosum</i> Desfontaines	<i>O. vulgare</i> L. subsp. <i>glandulosum</i> Desf.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Commune dans tout le Tell.</li> <li>- Endémique Algéro-Tunisienne.</li> <li>- Pousse dans les garrigues et broussailles.</li> </ul>
<i>Origanum floribundum</i> Munby	<i>Elongastipica</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Espèce rare. Pousse dans la partie nord centrale (Kabylie, Médéa, Blida).</li> <li>- Endémique d'Algérie.</li> <li>- Pousse en pâturage et surtout en montagne.</li> </ul>

### 1.2.7. Composition chimique des huiles essentielles de l'Origan

En fonction de son origine, les HE d'origan sont de composition très variable. Selon le rendement en huiles essentielles (volume d'HE obtenues / 100g de plante). Trois groupes distincts de différents taxons du genre *Origanum* sont mentionnés :

- Espèces pauvres en HE avec un taux inférieur à 0,5%( ml / 100g poids sec), exemple : une espèce Grecque endémique, *O. calcaratum*.
- Espèces possèdent un taux d'HE entre 0,5 et 2%, exemple : une espèce endémique à l'île de Crète, *O. microphyllum*.
- Espèces riches en HE possèdent un taux supérieur à 2%, exemple *O. vulgare* subsp. *hirtum* (origan Grecque), *O. onites* (Origan turque) et *O. glandulosum* (Origan Algérien) présente un taux en HE importante avoisinant les 4,8% [84].

Les composés fréquents chez l'Origan sont mentionnés dans la Figure 1.3). Le carvacrol est le composé majoritaire de l'HE d'origan ayant une teneur variant de 40 à 74%. Cependant dans certains cas, le thymol (isomère du carvacrol) est majoritaire. En effet le Thymol / carvacrol est majoritaire dans la plupart des espèces d'origan dont *O. floribundum* [85] et *O. vulgare. ssp.hirtum* [86]. Les composés Sesquiterpènes, Acide rosmarinique,  $\beta$ - caryophyllene, sabinene et germacrene D sont parfois majoritaires dans *Origanum vulgare L* [87 ; 88 ; 89].

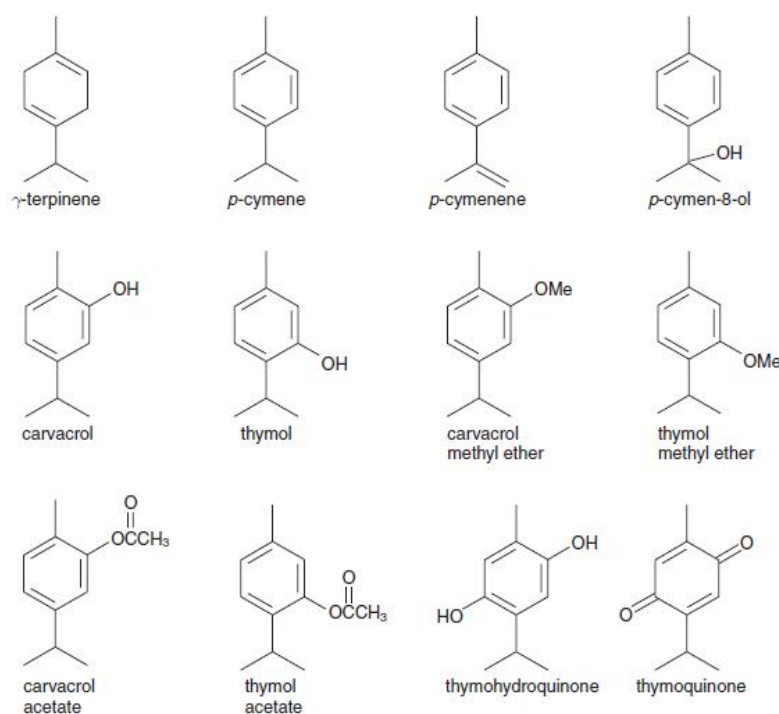


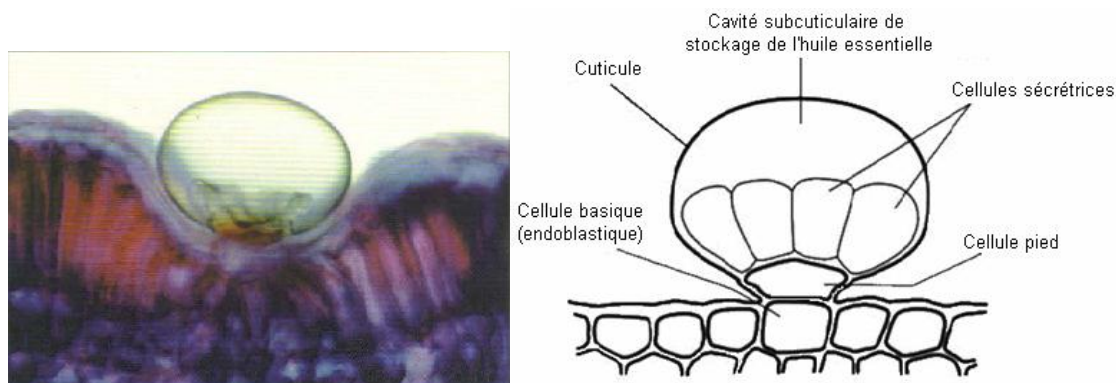
Figure 1.3 Principaux composés monoterpéniques rencontrés chez *Origanum* spp [90].

#### 1.2.8. Localisation cellulaire des HE de l'Origan

Chez la famille des Labiatae à laquelle appartient l'Origan, la présence des trichomes glandulaires qui sont des modifications des poils épidermiques sont observés. Ils sont situés à la surface des deux faces de la feuille [91], tige et fleur notamment à la base du calice et dans l'épiderme externe de la corolle.

Les cellules sécrétrices sont attachées à l'épiderme par une cellule basale. La surface externe du trichome est fortement cutinisée et l'HE s'accumule dans l'espace ou cavité subcuticulaire (Figure 1.4 a et b) [92].





a- Espace subcuticulaire rempli d'HE [92].

b- Structure schématisée [93].

Figure 1.4 : Coupe transversale de la feuille d'*Origanum heracleoticum*, (G x 420) (a) et (b).

### 1.2.9. Usages de l'HE d'Origan

#### 1.2.9.1. Usages externes

L'HE d'Origan a un effet cicatrisant. Elle est indiquée comme un traitement d'appoint adoucissant et antiprurigineux des affections dermatologiques, comme trophiques protecteurs dans le traitement des crevasses, écorchures, gerçures et contre les piqûres d'insectes [3]. Elle soulage les douleurs musculaires, rhumatismales, les enflures et les blessures externes [94 ; 95].

L'HE d'Origan ne doit jamais être appliquée seule directement sur la peau car elle est très irritante (dermocaustique). Elle est diluée à 20% maximum dans une huile végétale ou excipient de base pour son utilisation par voie externe. Elle est déconseillée pour les femmes enceintes, allaitantes ou les enfants de moins de 6 ans [96].

#### 1.2.9.2. Usages internes de l'HE d'Origan

L'Origan est employé pour ses propriétés apéritives contre les troubles gastro-intestinaux, tous les problèmes infectieux, les dysménorrhées et les rhumatismes. Il est également utilisé comme expectorant au cours des affections bronchiques aiguës bénignes [17]. L'HE d'Origan est dépurative, diurétique, apaise les nerfs, stimule les défenses immunitaires et aide aussi à lutter contre les insomnies [97].

### 1.3. Oxydation et activité antioxydante

L'hyperproduction des radicaux libres ou stress oxydatif est à la base des explications physiopathologiques des grandes maladies dites neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, Parkinson et le vieillissement cérébral, maladie cardiovasculaire comme l'athérosclérose, diabète et le cancer [98].

De même ces composés néfastes peuvent provoquer la peroxydation lipidique des aliments, durant leurs fabrication et stockage, ce qui cause la rancidité puis leurs détérioration irréversible [98]. La production de ces radicaux libres peut être limitée par les antioxydants.

#### 1.3.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié (s) sur les couches externes [99]. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron [100].

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages et polynucléaires). Ils sont également produits, pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose [101].

La formation des radicaux libres est induite par la consommation abusive d'alcool, des antibiotiques, des anticancéreux, du tabac et des produits chimiques [102]. L'exposition aux rayons X et UV provoque aussi la production des radicaux libres [103].

#### 1.3.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre la production des radicaux libres et la capacité de l'organisme à contrôler et réparer les dommages causés par ces derniers [104].

L'appellation espèces oxygénées réactives(EOR) inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote), mais aussi certains dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde (Tableau 1.3) [105].

Tableau 1.3 : Principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques [106].

Nom	Symbole
Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	$OH^{\cdot}$
Monoxyde d'azote	$NO^{\cdot}$
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulet	$^1O_2$
Peroxynitrite	$ONOO^-$

#### 1.3.2.1. Origine des EOR

Les EOR apparaissent donc comme des molécules produites par divers mécanismes physiologiques. A certaines doses, elles sont utiles à l'organisme, mais leurs productions peuvent devenir excessives ou résulter de mécanismes toxiques exogènes à l'organisme [107 ; 108].

#### 1.3.2.2. Conséquences des EOR et du stress oxydatif

L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les acides nucléiques (ADN et ARN) et les lipides spécialement les acides gras insaturés composants la membrane plasmique [103 ; 109].

De nombreuses études indiquent que le stress oxydatif est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes [110], allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète.

De plus, la plupart des maladies induites par le stress oxydatif apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes [111 ; 112]. Il augmente la production mitochondriale de radicaux libres avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés [113].

#### 1.3.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs, ce qui retarde ou empêche l'oxydation des substrats

biologiques [114 ; 115]. Ils vont intervenir comme « capteurs » de radicaux libres. C'est un processus d'oxydation de type radicalaire (Figure 1.5) [116].

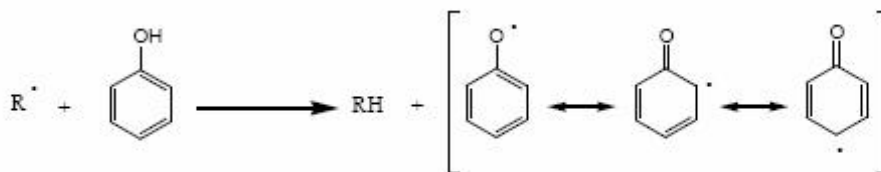


Figure 1.5 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.

Il existe trois types d'antioxydants : Antioxydants naturels, de synthèse et enzymes.

#### 1.3.3.1. Antioxydants naturels

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties de plantes supérieures. Ce sont pour la plupart des composés polyphénoliques. Les plus importants sont les flavonoïdes, les tocophérols et les acides phénoliques.

##### 1.3.3.1.1. Acide ascorbique (vitamine C)

La vitamine C peut prendre une forme réduite ou oxydée. Le passage de l'une à l'autre se fait par l'intermédiaire d'un radical libre, radical ascorbyle, et en présence de glutathion /glutathion-réductase. La vitamine C forme donc un couple redox avec une forme intermédiaire radicalaire capable de capter l'oxygène singulet et certaines espèces radicalaires [117].

##### 1.3.3.1.2. α-tocophérol (vitamine E)

Cette molécule liposoluble protège les graisses circulantes contre l'oxydation, ce qui constitue la première défense contre l'athérosclérose et en fait un protecteur cardiovasculaire [118].

##### 1.3.3.1.3. Huiles essentielles

Les huiles essentielles de plantes aromatiques comme celles de l'Origan et du thym possèdent de puissants composés antioxydants [117]. Le thymol et le carvacrol sont les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique qui ont des propriétés oxydo-réductrices. Ainsi ils neutralisent les radicaux libres et décomposent les peroxydes [119].

#### 1.3.3.1.4. Les composés phénoliques [119]

Les composés phénoliques regroupent les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins qui agissent comme des antioxydants par piégeage des radicaux libres.

#### 1.3.3.2. Les antioxydants de synthèse

Les antioxydants de synthèse habituellement utilisés sont les composés phénoliques comme le Butyl Hydroxy Anisole (BHA), Butyl,Hydroxy Toluène(BHT) et le Ter-Buty-Hydroxy-Quinone(TBHQ) et les esters de l'acide gallique [119].

#### 1.3.3.3. Enzymes comme antioxydants

Les enzymes utilisées comme antioxydants sont des enzymes qui participent à la neutralisation excédentaire en radicaux libres tel que l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), le glutathion peroxydase, certaines protéines de transport comme la ferritine et la ceruloplasmine [119].

#### 1.3.4. Mesure de l'état d'oxydation et du pouvoir antioxydant

De nombreuses méthodes analytiques sont employées dans les tests d'évaluation de l'efficacité des antioxydants, on citera quelques unes [119].

##### 1.3.4.1. Mesure des pouvoirs chélateurs et réducteur

Les principaux métaux de transition présents au sein des tissus biologiques sont le fer et le cuivre. Ces derniers catalysent l'oxydation des lipides par des voies enzymatiques et non enzymatiques [119].

##### 1.3.4.2. Mesure du pouvoir de piégeage des radicaux libres

Le piégeage des radicaux libres est le mécanisme d'action principal des antioxydants dans les aliments. Différentes méthodes ont été développées avec lesquelles l'activité antioxydante est évaluée par le piégeage des radicaux libres synthétiques dans un solvant organique polaire. Ces radicaux incluent la radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl DPPH et le radical cation 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) ABTS [119].

#### 1.4. Activité antimicrobienne

Face au problème soulevé depuis plusieurs années par la résistance des bactéries, la seule alternative fiable à l'usage des antibiotiques semble être celle des huiles essentielles [120].

Les HE d'Origan, thym, sauge, romarin et clou de girofle ont des propriétés antibactériennes et antifongique et ont une particularité d'être riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne [120].

Ces trois composés cités (eugénol, thymol et carvacrol) ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritica*, *Clostridium jejuni*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter pylori* [121]. Ils sont aussi de très bons agents antifongiques contre une large gamme de champignons parmi eux : *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* et bien d'autres [122].

##### 1.4.1. Pouvoir antimicrobien

###### 1.4.1.1. Concentrations Minimale Inhibitrice, Bactéricide et Fongicide (CMI, CMB et CMF)

La CMI est la plus faible concentration d'agent antimicrobien (HE) capable d'inhiber toute croissance de microorganisme visible en 18h d'incubation [123]. Elle est déterminée par l'utilisation d'une gamme de dilution de l'agent antimicrobien additionné à une série de tubes d'un milieu de culture standardisé [124].

La CMB ou CML (létale), correspond à la concentration en inhibiteur nécessaire pour que l'activité bactéricide soit totale sur un inoculum donné après un temps donné (24h). Elle est déterminée en milieu de culture par l'évaluation des survivants après élimination du composé inhibiteur [125]. La CMF est la Concentration Minimale Fongicide, utilisée si les espèces microbiennes étudiées sont des champignons.

Des composés isolés tels que le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries perméable, prémices de leur mort [126 ; 127].

La faculté de perturber la perméabilité cellulaire, accompagnée de la perte de l'osmose chimique sont bien la preuve d'une activité létale de certaines HE [128].

La majorité des expériences montre que les valeurs des CMI sont identiques aux CMB, ceci indique que les HE sont bactéricides [129].

#### 1.4.1.2. Souches microbiennes

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car une HE peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet [130]. Il est donc important de mentionner la dénomination complète de l'espèce botanique, du chémotype de l'HE ainsi que le Gram des microorganismes.

In vitro, certaines HE ont un effet microbicide supérieur à celui des antibiotiques [131]. En général, elles ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif [132 ; 133 ; 134].

#### 1.4.1.3. Composition chimique et pouvoir antimicrobien

L'activité antimicrobienne des HE se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leurs composés majoritaires : Phénols > alcool > aldéhyde > cétone > oxyde > hydrocarbures > esters [135 ; 136]. L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable [137].

##### 1.4.1.3.1. Mode d'action des HE

Le mode d'action des HE est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action [138 ; 139 ; 140].

- Les Alcools sont généralement plus connus pour leur activité létale que bactériostatique sur les cellules végétatives. Ils agissent en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation [141].
- Les Aldéhydes sont de puissants agents antimicrobiens. Un groupe aldéhydique conjugué à une double liaison est fortement électronégatif. Les composés électronégatifs peuvent induire des réactions de transfert d'électrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléiques [35].

- Les Phénols sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Le thymol et l'eugénol sont responsables de l'activité fongicide [142], et bactéricide des HE qui en contiennent [127 ; 128 ; 143].

Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les HE sont efficaces. Cependant les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité, la totalité de la composition chimique doit être prise en compte [129].

#### 1.4.2. Méthodes d'études du pouvoir antimicrobien (techniques par contact direct)

Les méthodes les plus importantes sont:

##### 1.4.2.1. Aromatogramme

C'est une technique microbiologique récente qui permet d'étudier à partir d'un antibiogramme la sensibilité des germes à différentes HE. Elle étudie le pouvoir antimicrobien et antifongique.

L'examen de la boîte à Pétri montre autour de certains disques, une auréole claire et transparente parfaitement circulaire, c'est le halo d'inhibition. Au delà de laquelle le milieu est trouble, par prolifération de germes (Figure 1.6) [144].

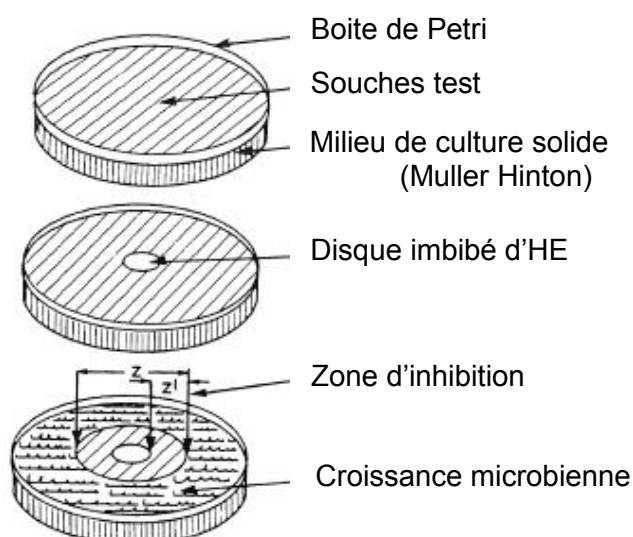


Figure 1.6 : Illustration de l'aromatogramme [145].



#### 1.4.2.2. Méthode de microatmosphère

Le principe de cette technique est d'ensemencer une boîte de Petri avec les germes tests. Quelques gouttes d'HE sont déposées sur papier filtre au fond et au centre du couvercle [146]. La boîte est incubée couvercle en bas, il se produit une évaporation des substances volatiles. La lecture est faite après incubation, avec l'observation de la croissance ou l'inhibition des germes [147] (Figure 1.7).

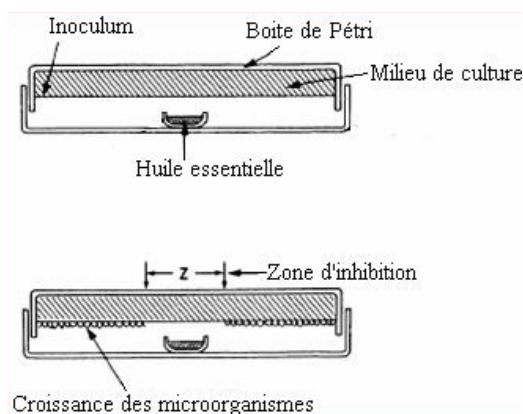


Figure 1.7: Illustration de la méthode des microatmosphères [145].

#### 1.4.2.3. Méthode de dilution et microméthode

Les HE à traiter peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de micro-organismes. Après incubation la lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu [148]. Par ailleurs, des microméthodes en milieu liquide ont été mises au point (méthode de microplaque)[149].

#### 1.4.2.4. Détermination des CMI, CMB et CMF

Les CMI, CMB et CMF sont déterminés par contact direct en milieu gélosé solide ou liquide [150].

#### 1.4.2.5. Limites des techniques par contact direct

Les techniques par contact direct sont fiables pour les agents antimicrobiens hydrosolubles mais posent un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE. Cependant, la technique de diffusion en milieu gélosé peut être améliorée par l'ajout de détergents qui facilitent la diffusion des HE dans la gélose [151;152].

### 1.5. Activite cicatrisante

Les HE sont des mélanges de terpènes (mono-, di- ou sesquiterpènes) et de dérivés terpéniques oxygénés (alcool, aldéhyde, cétone, acide et ester). Les activités principales des HE sont antiseptiques et cicatrisantes [153 ; 154].

Cette activité cicatrisante consiste à étudier la constitution de la peau, plaies et produits cicatrisants.

#### 1.5.1. Constitution de la peau

La peau est constituée de trois couches superposées (Figure 1.8) :

**L'épiderme / épithélium stratifié** est limité à l'extérieur par la couche cornée et à l'intérieur par la couche basale germinative.

**Le derme** est formé de tissu conjonctif, est une couche fibreuse dans laquelle circulent des vaisseaux capillaires et lymphatiques.

**L'hypoderme** sépare le derme des tissus sous-jacents. Sa constitution varie beaucoup selon la région du corps considérée. Il contient plus ou moins de panicules adipeuses.

La peau comporte de plus de deux types d'organes annexes :

- Les glandes sudoripares constituées par un long tube qui s'enfonce dans l'hypoderme en s'enroulant.
- L'appareil pilo-sébacé de constitution plus complexe. Au centre le poil est inclus dans une dépression cutanée qui constitue le follicule pileux au fond duquel il vient s'insérer. Une gaine épithéliale entoure le poil. Cette gaine devient très mince et se réduit à la seule couche germinative au niveau de la racine du poil. Dans la gaine vient se déverser le sébum sécrété par la glande sébacée. La paroi du canal excréteur de la glande est formée d'une mince couche de cellules épithéliales. Le sébum remplit les espaces libres de la gaine autour du poil.

Le pH à la surface de la peau est réglé par la sécrétion des glandes sudoripares. Il se situe en moyenne autour de 4,5 et contribue de façon importante aux mécanismes de défense de la peau [155].

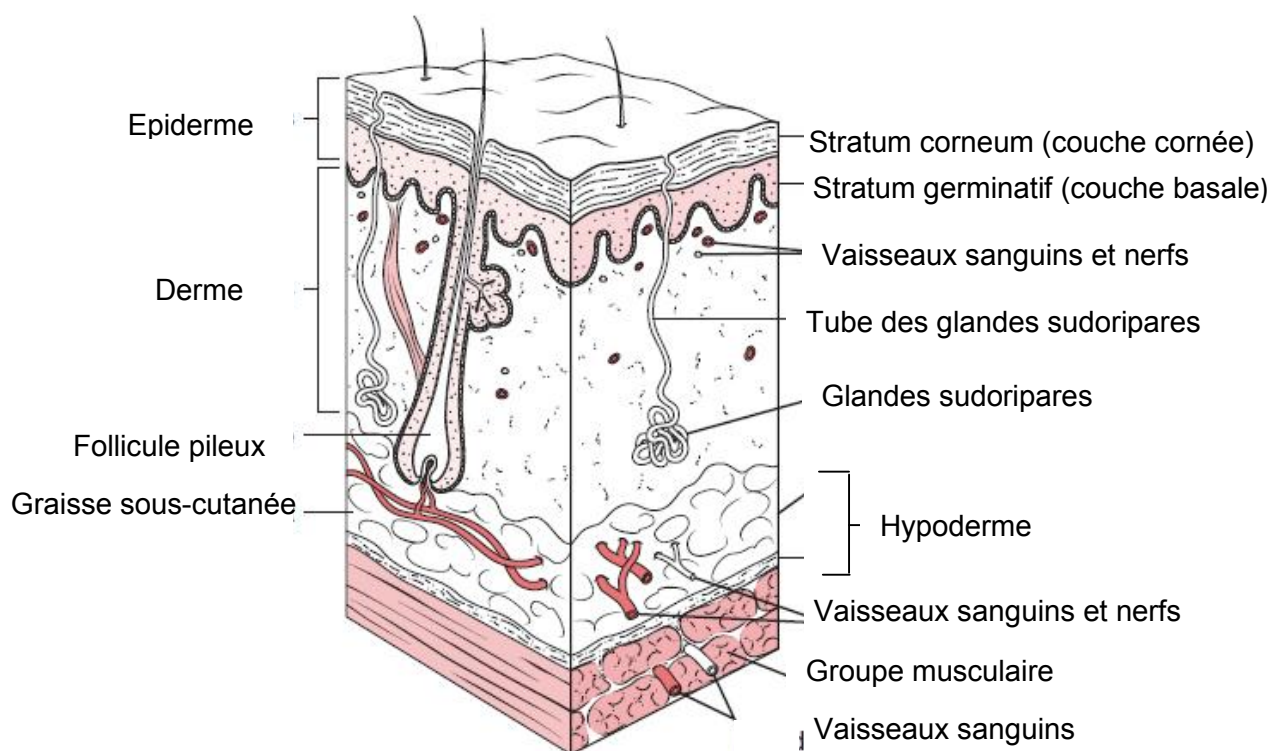


Figure 1.8 : Structure schématique de la peau [156].

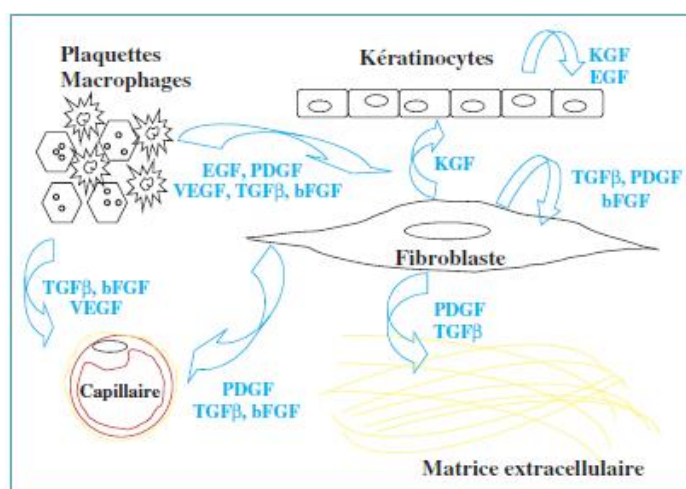
## 1.5.2. Plaies et cicatrisations

### 1.5.2.1. Dynamique d'une cicatrisation cutanée normale

Le modèle de cicatrisation d'une plaie cutanée aiguë représente en fait un type de description général, applicable à quelques variantes près à tous les processus de cicatrisation tissulaire.

Classiquement divisé en quatre phases (hémostase, phase détersivo-inflammatoire, phase proliférative et phase de remodelage), toutes les phases de la cicatrisation proprement dite se déroulent sur les quinze premiers jours après la blessure (Figure 1.9).

La cicatrice est l'état final stable et définitif qui n'intervient qu'après 6 à 12 mois. La période intermédiaire est désignée par le terme de «cicatrice jeune», qui est une phase où la cicatrice est rouge, dure, gonflée et douloureuse. Vers le 2<sup>ème</sup> mois, s'installe en général une poussée inflammatoire qui ne régresse que vers le 3<sup>ème</sup> mois [153].



a- Mécanisme cellulaire de la



b- Mécanisme moléculaire de la cicatrisation.

Figure 1.9 : Mécanisme cellulaire et moléculaire de la cicatrisation a et b [157].

#### 1.5.2.2. Modèles expérimentaux de cicatrisation sur animaux

Un modèle expérimental pour la cicatrisation cutanée est un système qui, de façon acquise ou induite, permet de reproduire un processus de cicatrisation cutanée ou une partie de ce processus, proche de ce qui est observé chez l'homme en physiologie ou en pathologie [158].

##### 1.5.2.2.1. Modèle incisionnel [158]

Il s'agit de réaliser une incision linéaire, calibrée en profondeur, les tissus adjacents ne sont pas traumatisés. Cette technique est utilisable sur tous les animaux, les plaies incisionnelles cicatrisent rapidement, mais ne sont pas adaptés pour des analyses histologiques ou pour l'étude de l'épithélialisation.

#### 1.5.2.2.2. Modèle excisionnel [158]

Une plaie excisionnelle est réalisée par l'exérèse d'un tissu, calibrée en superficie et en profondeur. Des biopsies sont réalisées aux différents stades de la cicatrisation permettant de récupérer des quantités de matériels tissulaires, cellulaires ou génétiques pour des analyses histologiques, biochimiques ou moléculaires .

#### 1.5.2.2.3. Brûlures

Des nécroses circonscrites peuvent être réalisées par des brûlures thermiques (chaud ou froid) ou électriques [158].

### 1.5.3. Produits cicatrisants

Les produits dits cicatrisants, spécialités thérapeutiques, contribuent à une cicatrisation physiologique sans entrave [158]. Les principes actifs sont les suivants :

#### 1.5.3.1. Antiseptiques

Ce sont les principes actifs les plus anciennement utilisés. Parmi eux :

- Les huiles essentielles de thym de romarin et origan contenant du thymol et du carvacrol, phénols antiseptiques.
- Les antiseptiques de synthèse classiques : Sulfapyridine et Résorcinol.
- Le baume de Perou contenant l'aldéhyde cinnamique.
- La propolis, issue de sécrétions de l'abeille.

#### 1.5.3.2. Stimulants cellulaires

- La vitamine A et les huiles de poisson (morue et flétan).
- La vitamine E associée à la vitamine A.
- *Centella asiatica* sous forme d'extrait titré hydroalcoolique favorise la biosynthèse du collagène par les fibroblastes (Madecassol ®) [158] (Figure 1.10).

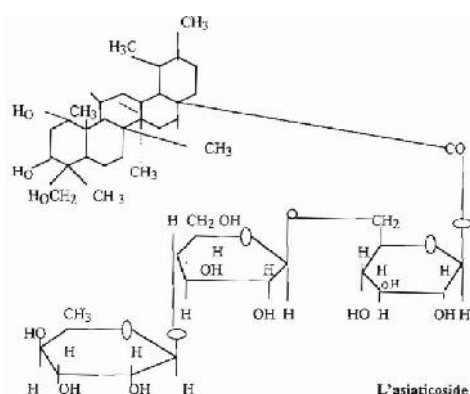


Figure 1.10 : Structure chimique de *Centella asiatica* (Madecassol®) [159].

- Le souci ou *Calendula officinalis*.
- L'*aloe vera* L, plante mexicaine utilisée comme cicatrisante dans la médecine populaire.
- L'oxyde de zinc, plus actif que le sulfate de zinc, favorise la prolifération des cellules épidermiques.

D'autres produits cicatrisants agissent de manière indirecte sur les plaies comme : les agents de déterision ( $\alpha$  chymotrypsine), facteurs de croissance (epidermal growth factor ou EGF) et les pansements (tulle gras) [158].

#### 1.5.4. Utilisation des HE dans les formes galéniques à utilisation topiques

Grâce aux qualités antiseptiques inhérentes aux HE, les problèmes de conservation sont moins importants. Le vieillissement lent permet une durée de conservation de deux à cinq ans [160].

##### 1.5.4.1. Composition des pommades dermiques

Les pommades se composent d'un excipient monophasé dans lequel peuvent être dispersés des liquides ou des solides selon (la pharmacopée européenne, 2008) [19]. Il existe trois types de pommade :

###### 1.5.4.1.1. Pommades hydrophobes

Ces pommades ne peuvent absorber que de petites quantités d'eau. Les excipients les plus communément employés pour la formulation de telles pommades sont : la paraffine solide, la paraffine liquide, les huiles végétales, les graisses animales, les glycérides synthétiques et les cires.

###### 1.5.4.1.2. Pommades absorbant l'eau

Elles peuvent absorber des quantités plus importantes d'eau et conduire à l'obtention d'émulsions « eau dans huile » : E/H tel que des alcools de graisse de laine, des esters de sorbitan ou « huile dans l'eau tel que des alcools gras sulfatés, des polysorbates, des esters d'acides gras. Les excipients utilisés sont ceux d'une pommade hydrophobe [161].

#### 1.5.4.1.3. Pommades hydrophiles

Elles sont des préparations dont l'excipient est miscible à l'eau, constitué de mélanges de macrogols (polyéthylène glycols) liquides et solides. Il peut contenir des quantités appropriées d'eau [161].

#### 1.5.4.2. Choix de l'excipient

L'excipient a un rôle de véhicule d'extraits de plante actifs par cette voie, mais a lui-même une fonction de protection, le choix de l'excipient se fera selon certains critères dont :

- . Les principes actifs à véhiculer et leur nature physico-chimique.
- . La nécessité ou non d'une pénétration satisfaisante du produit actif.
- . La durée d'application au niveau de la peau.
- . La tolérance cutanée.
- . Les facilités de réalisations de la préparation prescrite [162].

Il existe trois grands types d'excipients :

- Excipients huileux ou anhydres.
- Excipients aqueux ou hydrates.
- Excipients émulsionnés.

Parmi les excipients huileux, les plus importants sont cités :

##### 1.5.4.2.1. La vaseline

C'est une pâte onctueuse, blanchâtre, très grasse, compacte et imperméable à l'air et à l'eau. Il s'agit d'une dispersion d'hydrocarbures solides ou liquide. Elle ne pénètre pas dans la peau, c'est un constituant des pommades [162].

##### 1.5.4.2.2. La lanoline

Cette substance est obtenue à partir du suint imprégnant la laine de mouton, c'est un mélange d'ester d'acides et d'alcools à PM élevés. Par ses stéroïdes, elle est insoluble à l'eau, mais a l'avantage d'absorber deux fois son poids d'eau et forme ainsi une émulsion. La lanoline est très grasse, elle reste par sa consistance un excipient pour pommade et adhère bien à la peau. Elle est miscible à la vaseline, ce mélange est très couramment utilisé [162].

## CHAPITRE 2

### MATERIELS ET METHODES

#### 2.1. Matériel biologique utilisé

Nous avons utilisé de la matière végétale, souches microbiennes et animaux de laboratoire durant nos expérimentations.

##### 2.1.1. Site de prélèvement

La zone d'étude de notre travail se situe dans les montagnes Hammam Melouane (W.Blida) à 50km d'Alger. Elle englobe la partie centrale du parc de Chréa (Figure 2.1), où pousse l'espèce *Origanum floribundum* à l'état spontané.

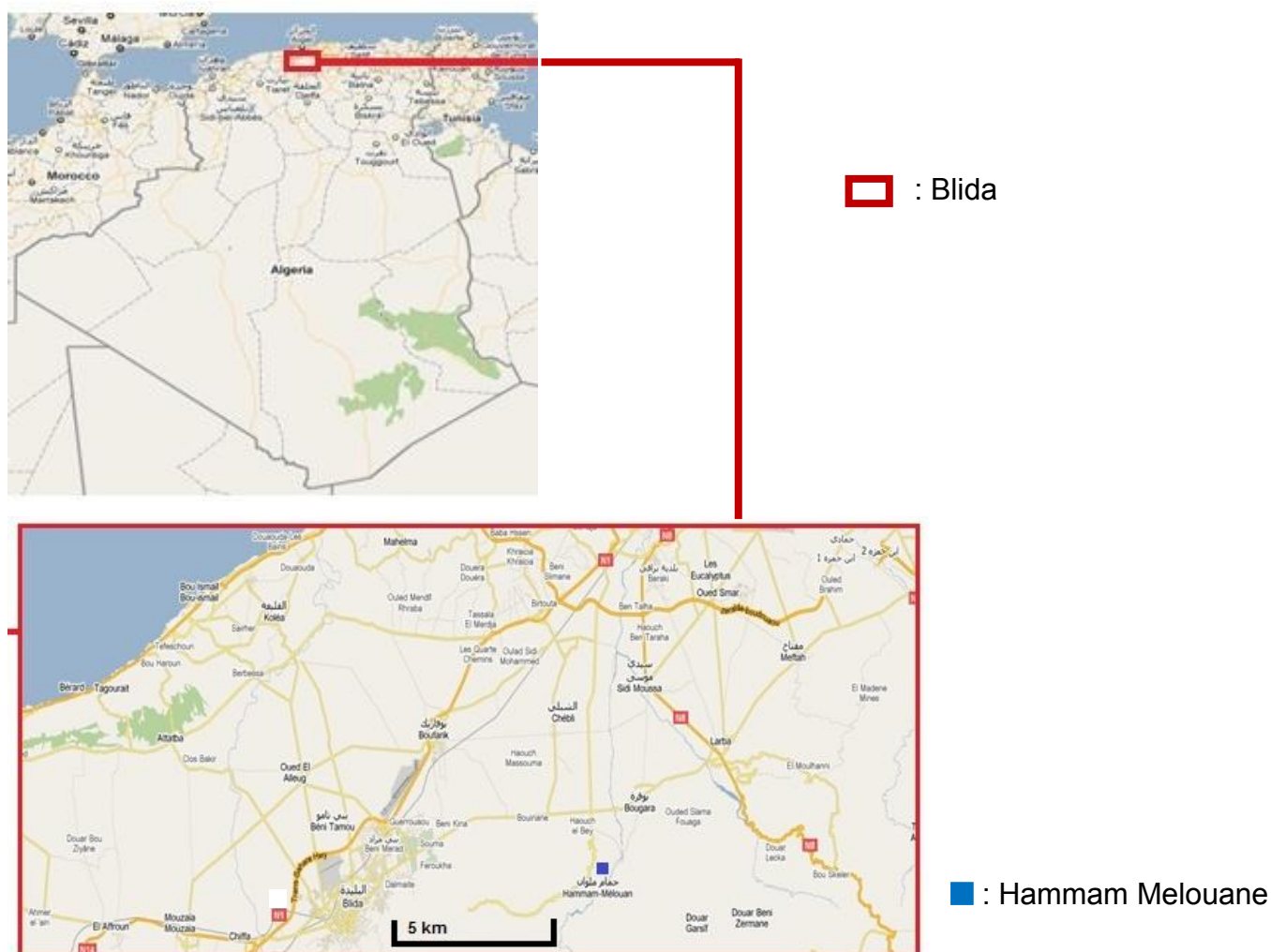


Figure 2.1: Localisation de la région d'étude.



Elle est à une altitude de 950 m, de latitude 36°27' et de longitude de 2°52'. La région est à étage bioclimatique sub-humide à hiver froid. Son sol est siliceux, pauvre en calcaire et la matière organique se minéralise lentement [163].

### 2.1.2. Présentation de la plante

L'*Origanum floribudum* Munby est une plante à tige prostrée à la base (Figure 2.2). Les jeunes tiges sont décombantes. Elles présentent des épis lâches à fleurs disjointes après la floraison. Les fleurs sont de couleur rose, la Corolle présente des pétales à lèvres sensiblement égales. Le calice bilabié possède 5 dents courtes. La plante peut atteindre ou dépasser un mètre de haut [74], (Figure 2.3).

Les parties aériennes de la plante ont été récoltées au mois de Juin 2009. Cette récolte coïncide au moment du début de la floraison.

L'identité, la nomenclature et la systématique de la plante ont été confirmées au niveau de l'Institut National d'Agronomie d'El Harrach par Hazzit [85], en comparaison avec l'espèce de l'herbier. Cette identification a été également prouvée par description de la plante selon Quezel et Santa [74].

Durant toute notre expérimentation, nous avons utilisé 20 kg de matière végétale constituée de fleurs, feuilles et tiges.

Des échantillons ont été conservés à l'état frais pour déterminer le taux d'humidité. Le reste de la matière végétale a été séché à l'air libre dans un endroit sec, à l'abri de la lumière et de l'humidité à une température ambiante est de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 2.1.3. Matériel animal

Les analyses pharmaco-toxicologiques ont été effectuées sur des lapins et rats Albinos provenant de l'animalerie du CRD-SAIDAL d'El Harrach (Appendice E).

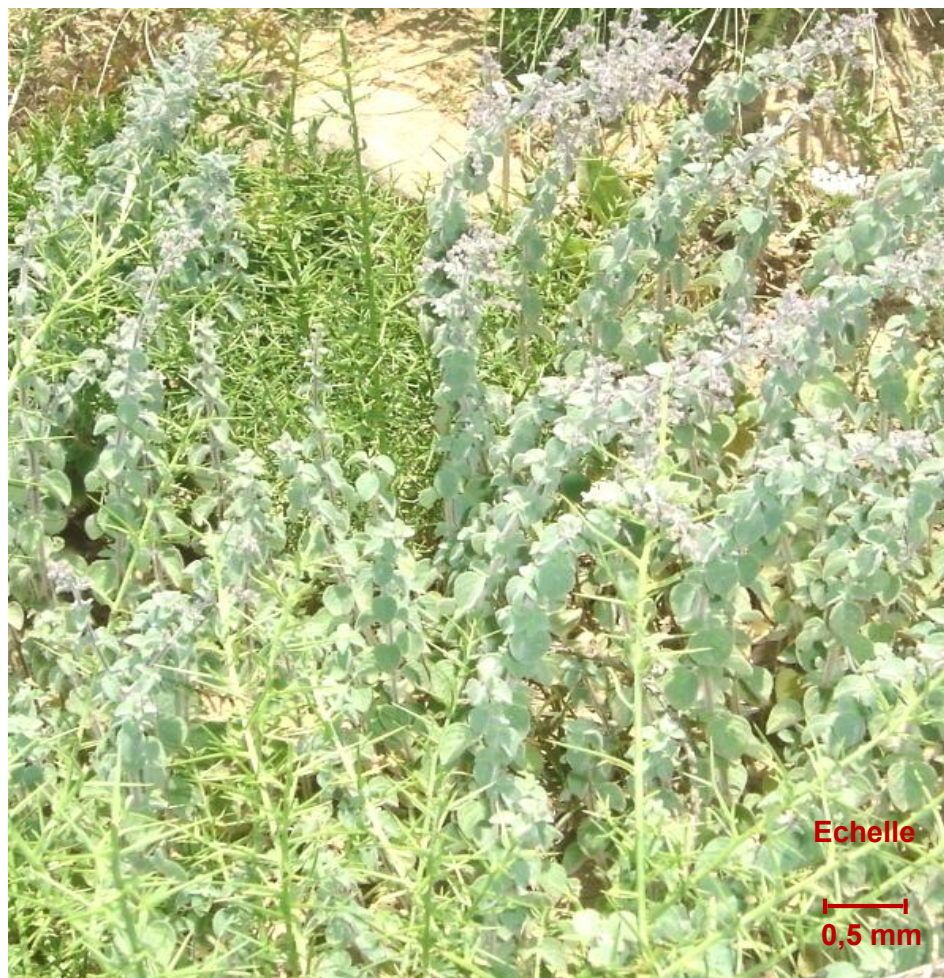


Figure 2.2 : Tiges prostrées d'*Origanum floribundum*  
(Original, 2009).



Figure 2.3 : Inflorescences d'*Origanum floribundum*  
(Original, 2009).

#### 2.1.4. Matériel bactériologique

Nous avons utilisé 11 souches provenant du laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL d'El Harrach. Nous avons retenu les bactéries suivantes :

*Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 2.2. Méthode d'étude

Notre expérimentation a été réalisée durant une période d'une année, allant de Juin 2009 à Juin 2010. Elle a été effectuée au niveau des structures de recherche notamment :

- Unité de recherche en Biotechnologies végétales du département de Biologie, Université Saad Dahleb de Blida.
- Laboratoires des huiles essentielles, microbiologie, chimie analytique, pharmacie galénique et pharmacotoxicologie du CRD-SAIDAL d'El Harrach.
- Centre de recherche scientifique & technique en analyses physico-chimiques (CRAPC), Bab Ezzouar (Alger).
- Laboratoire Anatomie et cytologie pathologique hôpital Parnet.

##### 2.2.1. Aspect microscopique

Afin de reconnaître les organes de l'origan et de localiser les sites sécréteurs d'HE, nous avons effectué des observations de ses organes végétatifs et reproducteurs à la loupe et au microscope.

##### 2.2.1.1. Observation à la loupe

L'observation de la plante à la loupe (type Motic) a été faite dans le but de reconnaître les différents organes de l'appareil végétatif et reproducteur de la plante et de mettre en évidence d'éventuelles poils sécréteurs et tecteurs.

##### 2.2.1.2. Observation au microscope

Dans le but de mettre en évidence les sites sécréteurs d'huiles essentielles, des coupes histologiques à main levée ont été réalisées au niveau des tiges et des feuilles.

Nous avons utilisé la technique de double coloration (vert de méthyl et rouge congo) [164] ; (Appendice D). Un montage des coupes dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle est observé immédiatement au microscope photonique doté d'un appareil photo (type Motic).

Des coupes histologiques au microtome ont été également faites au niveau de la tige, feuille et pétiole au niveau du laboratoire Cytologie-Histologie Anatomie Pathologie de l'hôpital Parnet (Appendice C1). Nous avons utilisé un protocole courant des plantes (Appendice D). Une coloration des coupes par la double coloration Carmino-vert a été réalisée [164]. Des coupes ont été préparées, observées et prises en photo.

### 2.2.2. Extraction d'Huile Essentielle d'*Origanum floribundum*

L'extraction de l'HE d'Origan a été effectuée par hydrodistillation. Cette méthode est préconisée par la pharmacopée Européenne [19].

Un extracteur pilote « Alambic semi industriel » a été utilisé. Il est constitué de quatre parties : la chaudière, la corbeille, le réfrigérant et l'essencier (Appendice C2).

#### 2.2.2.1. Protocole d'extraction de l'Huile Essentielle

Pour obtenir l'HE, une quantité de 10Kg de matière végétale sèche est entassée dans la corbeille qui est placée dans la chaudière. Un volume d'eau environ de 100 litres a été ajouté et la température de l'appareil est réglée à  $101^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  pour favoriser un maximum d'évaporation de l'eau et de l'HE sans la détruire et ceci grâce à un système de chauffage électrique.

Au cours du chauffage, l'eau évaporée est chargée d'HE. Elle migre vers le serpentín à l'intérieur du réfrigérant rempli d'eau froide qui circule en continu grâce à un système de circuit fermé, de sorte à ce que les températures avoisinent les  $12-13 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Les vapeurs chargées d'HE, se condensent en liquide puis sont récupérées dans l'essencier après une heure d'extraction.

L'HE est collectée en premier en ouvrant le robinet de l'essencier ensuite la deuxième séparation d'HE (phase organique) de l'hydrolat (phase aqueuse) se fait

avec une ampoule à décanter de 200 ml. Une décantation simple sans solvant est réalisée (Appendice C3).

L'HE est pesée pour le calcul du rendement puis conservée au frais à  $+4^{\circ}\text{C} \pm 1$ , dans un flacon en verre ombré et hermétiquement clos. Cette HE sera étudiée et analysée.

#### 2.2.2.2. Calcul du rendement en huiles essentielles

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée (MHE) à la masse de la matière végétale sèche (MVS), exprimées dans la même unité de masse multiplié par 100 [165], comme suit :

$$R\% = (MHE / MVS) \times 100$$

#### 2.2.2.3. Détermination du taux d'humidité

Nous avons utilisé l'appareil Dean et Starck (Appendice C4), pour déterminer le taux d'humidité dans les organes de la plante d'Origan.

Les étapes suivies sont les suivantes :

Le mode opératoire de la technique suit les étapes suivantes :

- Immerger 20gr de la matière végétale dans le toluène, dans un ballon de 200ml (la plante doit être immergée complètement).
- Surmonter le ballon d'un réfrigérant, ce dernier est muni d'un tube collecteur gradué.
- Porter à ébullition (2 à 3 gouttes par seconde), jusqu'à ce que la plus grande partie de l'eau soit entraînée (niveau d'eau constant) et le solvant devient limpide ce qui correspond à 24heures.
- Calculer en pourcentage la teneur en eau de la matière végétale à l'aide de la relation recommandée par la pharmacopée européenne [19].

$$H (\%) = (V/M) \times 0,998 \times 100.$$

Avec : H : taux d'humidité (%).

V : volume d'eau (ml).

M : Masse : masse de la matière végétale (fraîche ou sèche) en gramme.

0,998 : densité d'eau.

#### 2.2.2.4. Etude de la cinétique de l'extraction de l'huile essentielle

Dans le but de détermination le temps d'extraction des HE de l'Origan, nous avons tenté d'étudier la cinétique de l'extraction de l'huile de la plante sèche.

La réalisation de la cinétique, de l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation à l'échelle de laboratoire, nécessite un dispositif (Appendice C5).

Les différentes étapes suivies sont mentionnées dans Appendice D3.

#### 2.2.3. Caractérisation de l'HE d'*Origanum floribundum* munby

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

- L'appréciation des caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur et flaveur).
- La détermination des indices physico-chimiques (densité, indice de réfraction, indice d'acide, pouvoir rotatoire, indice d'ester et miscibilité à l'éthanol).
- L'obtention des profils chromatographiques et une quantification relative des différents constituants.

##### 2.2.3.1. Indices physico-chimiques

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) [18].

##### 2.2.3.1.1. Densité relative à 20°C : Norme NF T 75-11

Elle est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'HE à 20°C, à la masse d'un égal volume d'eau distillée à la même température. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est :  $d_{20}^{20}$ . Elle se mesure à l'aide d'un pycnomètre et donné par la relation suivante :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

où  $m_0$  : la masse en gramme du pycnomètre vide.

$m_1$  : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau.

$m_2$  : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'HE.

##### 2.2.3.1.2. Indice de réfraction à 20°C : Norme NF T 75-112

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un réfractomètre de type Bellinghame. Quand la détermination est effectuée à une température ( $T^\circ\text{C}$ )

différente de 20°C, nous effectuons une correction à 20°C par le biais de la formule :

$$n_D^{20} = n_D^T + 0,0004 (T - 20)$$

$n_D^T$  : est la lecture obtenue à la température T, à laquelle a été effectuée la détermination.

#### 2.2.3.1.3. Pouvoir rotatoire : Norme NF T 75-113

Il s'agit de l'angle exprimé en milliradians, exprimant la déviation de plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde 589,3 nm ( $\pm 0,3$ nm), correspondante aux raies D du sodium, lorsque celle-ci traverse une épaisseur de 100 mm de l'HE dans des conditions déterminées de température. Le pouvoir rotatoire est donné par la relation suivante :

$$\alpha_D^t = A / l \times 100$$

Ou :  $\alpha_D^t$  : pouvoir rotatoire.

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

l : est la longueur du tube utilisé en mm.

#### 2.2.3.1.4. Miscibilité à l'éthanol : Norme NF T 75-101

Selon AFNOR [18], une huile est dite miscible à V volume et plus de titre alcoométrique déterminé à la température de 20°C, lorsque le mélange de un volume d'huile essentielle considérée avec V volume de cet éthanol, est limpide et le restera même après l'addition graduelle d'éthanol de même titre, jusqu'à 20 volumes.

#### 2.2.3.1.5. Indice d'acide : Norme NF T 75-103

L'indice d'acide IA est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH), nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle.

L'indice d'acide est donné par la formule suivante :

$$IA = V \cdot C \cdot 56,11 / m$$

Où : **V** : le volume, en millilitres de la solution

d'hydroxyde de potassium utilisée pour le titrage.

**C** : la concentration exacte en moles par litres, de la solution d'hydroxyde de potassium.

**m** : la masse en grammes de la prise d'essai.

### 2.2.3.1.6. Indice d'ester : Norme NF T 75-104

L'indice d'ester IE est le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle.

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

Où :  $V_0$  : le volume en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc.

$V_1$  : le volume en millilitres de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination.

$m$  : la masse en grammes de la prise d'essai.

### 2.2.3.2. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CPG/SM

Cette analyse a été faite au laboratoire de chromatographie au centre de recherche scientifique & technique en analyses physico-chimiques (CRAPC) de Bab Ezzouar Alger (Appendice C6), selon les conditions opératoires suivantes :

#### 2.2.3.2.1. Chromatographie phase gazeuse(CPG)

- Appareil de type GC 6890 séries GC Systems (HP Agilent technologies).
- Colonne : capillaire DB1 (100% méthylpolysiloxane) ; longueur : 60m ; diamètre interne du film de la phase : 0,25  $\mu$ m, épaisseur du film de la phase : 0,25 $\mu$ m.
- Programmation de la température : 60°C en isotherme pendant 8 minutes puis augmentation de la température à raison de 2°C/min jusqu'à 280°C puis laissée en isotherme pendant 30 min.
- Volume injecté : 0,2  $\mu$ l ; mode d'injection : Splitless à T= 250°C.
- Température de détection : 280°C (interface).
- Gaz vecteur : hélium ; débit du gaz vecteur : 0,5ml / min.

#### 2.2.3.2.2. Spectrométrie de masse

- Appareil : HP-5973 (HP Agilent Technologies).
- Mode de détection : Scan : 30-550amu.
- Potentiel d'ionisation : 70 ev.
- Pression (Source, analyseur) : 6,75 Psi.



### 2.2.3.2.3. Mode d'identification

L'identification des composés a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétentions en programmation de température à ceux cités par la littérature [23] ainsi qu'à ceux d'étalons injectés dans les mêmes conditions. Pour le calcul de ces indices, un mélange d'alcane (C<sub>8</sub>-C<sub>16</sub>) est injecté dans les mêmes conditions opératoires de l'échantillon. Les indices de rétention désignés par IR sont calculés selon la formule suivante :

$$IR = 100z + 100n \frac{t_{RC} - t_{Rz}}{t_{Rz+n} - t_{Rz}}$$

$t_{RC}$  : temps de rétention du composé étudié.

$t_{Rz}$  : temps de rétention de l'alcane à z atomes de carbones qui précède le composé étudié.

$t_{Rz+n}$  : temps de rétention de l'alcane à z+n atomes de carbones qui suit le composé.

n : différence des nombres d'atomes de carbone.

L'identification des constituants des HE extraites est basée sur :

- La comparaison des spectres de masses des molécules inconnues à ceux des composés purs cités par la littérature [23].
- En tenant compte de l'ordre d'élution du composé sur la colonne considérée.
- En tenant compte de la proposition et du pourcentage de probabilité de présence du composé fournis par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse des banques de spectres de la National Institute of Standard Technology (NIST 2002 et de la Wiley 7N).
- Comparaison des indices de rétentions en programmation de température à ceux cités par la littérature sur le même type de colonne [23].

### 2.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante des HE d'Origan

L'activité antioxydante a été évaluée in vitro par deux méthodes citées par la littérature [166 ; 167] : Le pouvoir réducteur et l'activité d'inhibition du radical DPPH (2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). En général, le pouvoir antioxydant des HE

testées a été estimé par comparaison avec un antioxydant de synthèse qui est le BHT et antioxydant naturel ( $\alpha$ -tocophérol).

#### 2.2.4.1. Mesure du pouvoir piégeage du radical DPPH+

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

##### 2.2.4.1.1. Principe

La capacité de céder des hydrogènes par les HE ou par certains composés purs, est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique. Cette méthode suit la disparition de la couleur violette d'un solvant polaire comme l'éthanol contenant le radical libre DPPH<sup>•</sup> (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) à température ambiante.

Dans ce test le piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> est suivi par la diminution de l'absorbance à 517nm qui est due à la réduction du radical par l'antioxydant (AH) contenu dans les échantillons (Figure 2.4).

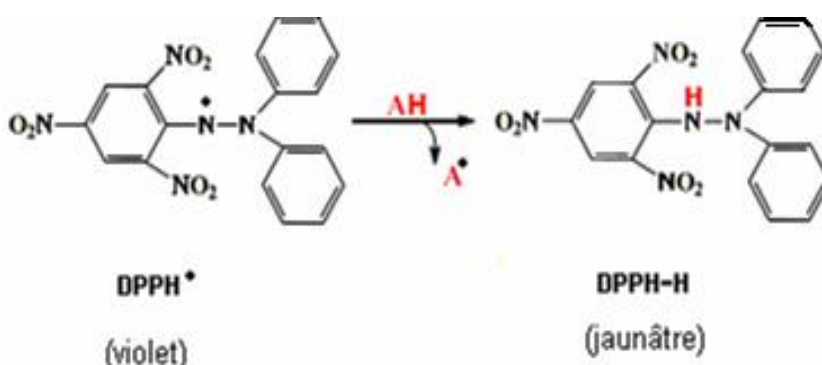


Figure 2.4 : Réaction du radical DPPH avec un antioxydant AH.

##### 2.2.4.1.2. Mode opératoire

La solution de DPPH a été préparée à une concentration de 60 $\mu$ M dans l'éthanol absolu. Le test du DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par Cuendet et al., [166], Burits et Bucar [167], où 25 $\mu$ l de chacune des dilutions des HE testées et de certains composés purs tels que le BHT sont mélangés dans la cellule placée dans la cuvette de spectrophotomètre avec 975  $\mu$ l de la solution éthanolique de DPPH (60 $\mu$ M). Après une période d'incubation de 30mn à l'abri de la lumière et de l'oxygène atmosphérique et à la température ambiante du

laboratoire, l'absorbance est lue à 517 nm. Les expériences sont réalisées en 3 répétitions pour chaque concentration.

Le BHT et Tocophérol ont été utilisés comme témoins (référence de comparaison). Le pourcentage d'activité (I %) est donné par la formule suivante :

$$I(\%) = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{ech}}) / (A_{\text{blanc}})] \cdot 100$$

Où :

A blanc : Absorbance du témoin (nm), il représente l'absorbance du DPPH au temps zéro avant l'addition de l'échantillon (HE ou témoin) à une concentration donnée.

A ech : Absorbance de l'échantillon testé après 30mn.

#### 2.2.4.1.3. Determination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC50)

Elle est définie comme étant la quantité où la concentration d'antioxydants (HE ou toute autre substance utilisée comme antioxydant) nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux.

C'est la concentration nécessaire pour obtenir une activité en % égale à 50. Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant.

#### 2.2.4.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur suit le principe et mode opératoire suivants :

##### 2.2.4.2.1. Principe

Le principe consiste à l'aptitude de l'HE à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure-Fe<sup>3+</sup> en Fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>), est évaluée par la méthode décrite par Oyaizu [168].

##### 2.2.4.2.2. Mode opératoire

L'estimation du pouvoir réducteur des échantillons étudiés (HE, BHT et Tocophérol) est obtenue selon le protocole expérimental de la figure 2.5.

L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur. Le test a été répété 3 fois pour chaque échantillon étudié.

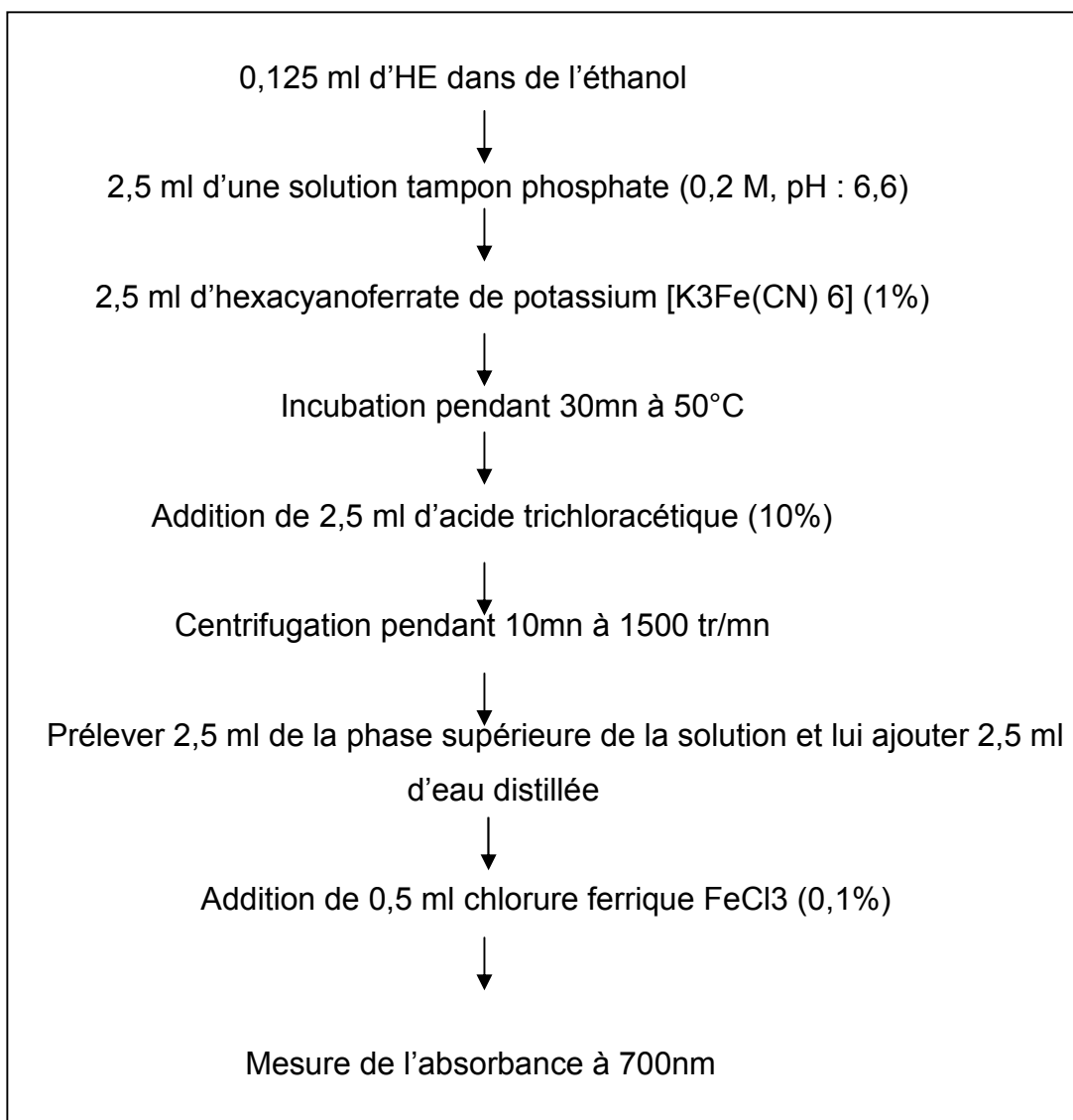


Figure 2.5 : Procédé de la mise en œuvre du test du pouvoir réducteur.

#### 2.2.5. Etude de l'activité antimicrobienne des HE d'*Origanum floribundum*

Dans le but de mettre en évidence le pouvoir antiseptique des HE d'Origan, nous avons utilisé deux méthodes qualitative et quantitative, en procédant à des tests sur une sélection de souches de référence bactérienne et fongique connues et la plupart d'elles qualifiées comme dangereuses pour l'homme et l'animal.

Les tests ont été réalisés au niveau du CRD-SAIDAL (El Harrach, Alger). Le principe des méthodes est mentionné dans titrage des ATB « Pharmacopée

Européenne », les modes opératoires quand à eux, ont été approuvés par la directrice du laboratoire de Microbiologie du CRD-SAIDAL [19].

#### 2.2.5.1. Etude qualitative de l'effet antimicrobien (aromatogramme)

L'aromatogramme ou méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisé par Zaika et *al.*, [145].

##### 2.2.5.1.1. Principe

La méthode des aromatogrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose (diamètre : 9 mm) imprégné d'HE à tester, à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de pétri etensemencée avec le microorganisme testé. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (mm) de la zone claire autour du disque indemne de colonies (halo translucide) [169], appelée : zone d'inhibition (Figure 2.6).

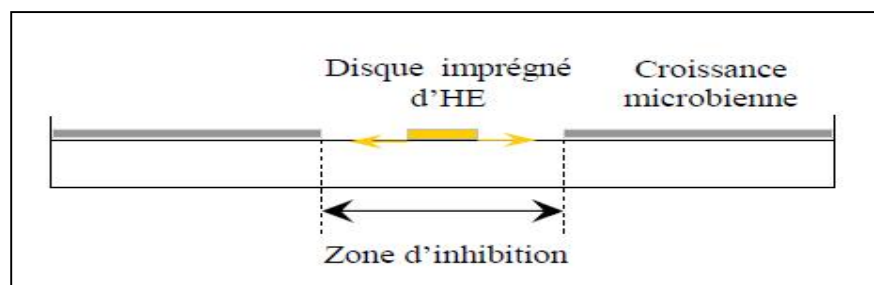


Figure 2.6 : Principe simplifié de la méthode des aromatogrammes [170]

##### 2.2.5.1.2. Souches microbiennes testées

Les souches microbiennes utilisées proviennent de la collection ATCC (American Type Culture Collection) du laboratoire de microbiologie du CRD, le nombre retenu est de 11 : 09 souches bactériennes (05 Gram+ et 04 Gram-) et 02 levures (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Caractéristiques des souches microbiennes testées.

Nom de la souche	N°ATCC	Gram	Famille	Principales infections causées
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	Bacilliaceae	--Gastro-entérites.
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	Bacilliaceae	--Intoxications alimentaires.
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	Alcaligenaceae	--Infections des voies respiratoires supérieures. --Bronchites, pneumonies.
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	Enterobacteriaceae	--Diarrhées dysentériques. --Gastro-entérites.
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	Enterococcaceae	--Douleurs abdominales --Diarrhées aiguës.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	Enterobacteriaceae	--Vasodilatation. --Troubles neurologiques et gastro-intestinaux. --Risques d'abcès pulmonaire.
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	Micrococcus	--Maladies nosocomiales chez des patients immunodéprimés.
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae	--Crampes abdominales. --Troubles digestifs.
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococcaceae	--Gastro-entérites. --Infections urinaires. --L'ostéomyélite et l'arthrite.
<i>Candida albicans</i>	24433		Cryptococcaceae	--Lésions cutanées. --Infections œsophagiennes. --Infections génitales.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601		Saccharomycetaceae	--Souche non pathogène.

[23].

### 2.2.5.1.3. Protocole expérimental

Durant nos expérimentations, nous avons suivi les étapes suivantes :

#### 2.2.5.1.3.1. Préparation de l'inoculum

Les suspensions bactériennes ont été réalisées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18h pour les bactéries et 48h pour les levures. Elles sont mises ensuite dans 9ml d'eau physiologique stérile (NaCl à 9‰), puis agiter au vortex pendant 10 secondes.

La lecture de la densité optique est effectuée en utilisant un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620nm. Cette dernière est comprise entre 0,22 et 0,32 pour les bactéries sauf pour les *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium* où la densité est comprise entre 0,3 et 0,4. Elle est de 2 et 3 pour les levures, ce qui correspond à une concentration optimale de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml (AFNOR, 1989 et Standardisation de l'antibiogramme selon l'OMS, 1999) [123].

#### 2.2.5.1.3.2. Préparation des milieux de culture

Les milieux gélosés déjà liquéfiée dans un bain Marie à  $95 \pm 3^\circ\text{C}$  (Muller-Hinton : MH pour les bactéries et Sabouraud : SAB pour les levures), sont versés aseptiquement dans des boites de pétri à raison de 15ml par boite avec 3 répétitions par souche. Les milieux sont refroidis et solidifiés sur une paillasse.

#### 2.2.5.1.3.3. Préparation de la deuxième couche du milieu

Les milieux gélosé (Muller-Hinton et le Sabouraud) sont fondus dans un bain Marie à  $95 \pm 5^\circ\text{C}$ , puis on abaisse la température jusqu'à  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  et nous les remplissons dans des flacons de 50ml.

Les milieux sontensemencés avec 200µl de chaque suspension microbienne et une agitation manuelle est réalisée. Un volume de 4ml de chaque milieu est inoculé sur la surface de la première couche (couche support) de gélose solidifiée, cette couche est étalée immédiatement en faisant pivoter la boite sur elle-même pour avoir une surface uniforme. Les milieux sont laissés solidifier sur la paillasse.

#### 2.2.5.1.3.4. Dépôt des disques

A l'aide d'une pince stérile, nous prélevons un disque de cellulose (9 mm de diamètre), stérile (stérilisé par la lumière UV), nous l'imbibons avec l'HE à tester

en mettant seulement en contact le bout du disque, celui-ci va absorber progressivement l'HE jusqu'à imprégnation totale du disque. Nous déposons le disque sur la surface de la gélose, puis nous laissons diffuser sur la paillasse pendant 30 minutes. Nous incubons à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures.

#### 2.2.5.1.3.5. Lecture

Le diamètre des zones claires autour des disques (zone d'inhibition) est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

L'activité antimicrobienne de l'HE est évaluée en fonction du diamètre des disques d'aromatogramme (mm ou cm), des zones d'inhibition de la croissance microbienne.

L'estimation de l'activité antimicrobienne de l'HE est basée sur une échelle de mesure, mise en place par Meena et Sethi (1994) [171] et Ela et al (1996) [172]. Ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 04 classes :

- ✓ Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est  $> 28$ mm.
- ✓ Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 16 mm et 28 mm.
- ✓ Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 10 mm et 16 mm.
- ✓ Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est  $< 10$  mm.

#### 2.2.5.2. Etude quantitative de l'effet antimicrobien [114 ; 173]

L'évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne des HE d'*Origanum floribundum*, consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI et la concentration minimale bactéricide CMB et fongicide CMF sur les microorganismes testés (bactéries et levures).

##### 2.2.5.2.1. Détermination des CMI

Le principe consiste à effectuer des dilutions de l'HE dans le milieu gélosé solide MH pour les bactéries et SAB pour les levures, puis inoculer ce milieu avec



les souches testées en utilisant des disques absorbants. Grâce à ces dilutions nous pouvons déterminer la plus faible concentration inhibant la croissance microbienne.

Le protocole expérimental retenu est le suivant :

#### 2.2.5.2.1.1. Préparation de l'inoculum

Nous avons réalisé une série de dilution allant  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ , à partir de jeunes cultures (18h à 24h pour les bactéries et 48h pour les levures). Ensuite des suspensions de  $10^8$  germes /ml pour chaque souche testée ont été préparées.

#### 2.2.5.2.1.2. Le dénombrement

- Ensemencer en profondeur des boîtes de Petri, pour chaque suspension microbienne par la dilution  $10^{-6}$  à raison de 1ml par boîte.
- Couler les boîtes contenant les suspensions par les milieux maintenus en surfusion à 45°C, gélose trypticase soja (TSA) pour les bactéries et SAB pour les levures. Les milieux se solidifient.
- Incuber les boîtes ensemencées, à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures. La lecture se fait par dénombrement des colonies obtenues en utilisant un compteur de colonies.

En appliquant la formule suivante :  $X = N \times 1/v \times 1/d$ .

X : concentration microbienne de la suspension mère.

N : nombre de colonies.

v : volume de la prise d'essai (déposé sur la boîte de pétri).

d : dilution de la suspension microbienne.

La dilution utilisée pour la réalisation de la CMI est la  $10^{-4}$  germes/ml.

#### 2.2.5.2.1.3. Préparation de la gamme de dilution de l'HE

Un volume de 200 ml du milieu à 95°C est liquéfié dans un bain Marie, 1ml de Tween 80 est ajouté. Une dilution de 2% de l'HE à tester est préparée en diluant 1ml d'huile essentielle dans 50 ml du milieu.

L'homogénéisation du 1<sup>er</sup> flacon est faite, puis versement de 25ml de son contenu dans un autre flacon qui est ajusté à 50ml de milieu, pour avoir la dilution 1%. Procédé est utilisé jusqu'à obtention de la dilution 0,03%.

Le versement de 20 ml dans chaque boîte de Pétri est réalisée, à partir de chaque dilution préparée et laisser solidifier. Les boîtes sont partagées en deux parties :

Une partie estensemencée par spotage à l'aide d'une microseringue de 3 $\mu$ l des suspensions microbiennes de la dilution 10<sup>-4</sup>.

La deuxième partie où sont déposés des disques celluloseux imbibés avec 3  $\mu$ l des suspensions microbiennes de la dilution 10<sup>-4</sup>, dans le but de déterminer les CMB et CMF.

Les boîtes sont laissées sur la paillasse 30 minutes pour la diffusion puis incubées à 37  $\pm$  1°C pendant 24h pour les bactéries et à 25  $\pm$  1°C pendant 48h pour les levures.

#### 2.2.5.2.1.4. Lecture

Nous parlerons de CMI là où aucune croissance visible n'est constatée au niveau des spots tout en sachant que la présence d'une ou deux colonies n'est pas prise en considération.

#### 2.2.5.2.2. Détermination des CMB et CMF

Après repérage des disques ou aucune croissance n'est présente lors de la détermination des CMI, l'expérimentation se poursuit en vue de la détermination des CMB et CMF.

Le principe de la technique consiste à déterminer la plus faible concentration de l'HE, où aucune sub-croissance microbienne n'est visible après subculture dans un milieu indemne d'HE à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48 h pour les levures.

Le protocole expérimental consiste à liquéfier les milieux MH pour les bactéries et SAB pour les levures dans un bain Marie, couler les boîtes de Pétri et laisser solidifier. Un prélèvement qui se fait aseptiquement avec une pince stérile, les disques correspondant aux concentrations de l'HE où aucune croissance n'est observée pour chaque souche lors de la détermination des CMI. Les disques sont

replacés dans des boites de Pétri déjà préparées. L'incubation à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  est effectuée pendant 24h pour les bactéries et à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 48h pour les levures. Des lectures à l'œil nu sont faites, la CMB et CMF sera la où aucune subcroissance d'une souche donnée n'est constatée après subculture.

#### 2.2.6. Préparation d'une pommade à usage topique

L'objectif de notre étude est de mettre au point une formule galénique topique adaptée aux HE d'*Origanum floribundum*. Elle a été réalisée au niveau du laboratoire pharmacie galénique du CRD de SAIDAL [155].

##### 2.2.6.1. Formulation de la pommade

Nous avons préparé une pommade à base d'HE en suivant les critères suivants :

###### 2.2.6.1.1. Choix du principe actif (PA)

Le PA est représenté par les HE de l'Origan. Ces HE trouvent leur utilisation dans la désinfection des plaies, ulcérations, les brûlures et diverses affections cutanées [20].

###### 2.2.6.1.2. Choix de la pommade

La pommade a une action locale au niveau de la peau, donc une pénétration des principes actifs plus ou moins en profondeur selon les cas. Elle pénètre dans l'épaisseur de l'épiderme, allant au derme, et même l'hypoderme. Elle peut aussi agir au niveau des tissus sous jacents [155].

###### 2.2.6.1.3. Choix des excipients

Notre choix pour les excipients a été motivé par des critères standardisés (nature physico-chimique des PA à véhiculer, bonne tolérance cutanée et surtout habituellement utilisés en pommades). Les ingrédients utilisés lors des formulations des pommades sont consignés dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Excipients de la pommade à base d'HE d'*Origanum floribundum*

[161 et 174].

Nom	Synonyme/Dénomination INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)	Caractères	Point de fusion	Usages	Concentration moyenne
Lanoline	Graisse de laine, Lanoléine, lanoline anhydre, lanoline purifiée	Masse jaune, épaisse insoluble dans l'eau	40°C	Stabilise les émulsions H/L. Excipient pour pommades, pénétrant, émollient. Peut absorber par trituration jusqu'à deux fois son poids d'eau	10 à %20 (pommades, crèmes et laits)
Vaseline	Pétroléine, petrolatum, petrolum jelly, graisse de pétrole	Substance blanche, onctueuse, pâteuse, neutre et insoluble dans l'eau	40°C	Employée dans les pommades d'action superficielle, comme elle ne rancit pas, elle donne des pommades de bonne conservation	(10-30%(crèmes) Jusqu'à 100% pommades et onguents

#### 2.2.6.1.4. Préparation officinale et conditionnement de la pommade dermique

La formule de base sur laquelle nous avons préparé notre pommade provient du formulaire thérapeutique magistral [161, 175] (tableau 2.3).

Tableau 2.3 : Composition de la pommade dermique.

Dénomination INCI	Concentration (%)
Petrolatum	80-95
Lanoléine	5-20
<i>Origanum</i> essential oil	0,5 - 2 (qsp 100 et pH 6)

Le protocole de fabrication est celui d'une pommade classique selon le mode opératoire suivant [161]:

Peser et incorporer de lanoline et petrolatum dans un bécher en acier inoxydable avec bord et anse selon les bonnes pratiques de fabrication des médicaments (BPF) [162].

- Porter le bécher au bain Marie à 60°C jusqu'à fusion complète des deux composés. Ces derniers sont mélangés sous une agitation mécanique avec un appareil type mélangeurs malaxeurs à mouvement planétaire et racloir muni d'une turbine (agitateur à hélice) (Appendice C7).
- Ajouter l'HE d'Origan avec un compte goutte sous une homogénéisation continue (50 gouttes au gramme [161]), à température ambiante (25-30 ± 2°C).
- Notre arôme et conservateur sont les HE et la durée de conservation de la pommade coïncide avec celle de l'HE.
- Le conditionnement se fait en tube aseptiquement (Appendice C8).

#### 2.2.6.2. Contrôles physico-chimiques des pommades dermiques

Une grande diversité de contrôles a été nécessaire pour définir les caractéristiques de la préparation topique obtenue selon des méthodes homologuées [161 ; 162].

##### 2.2.6.2.1. Contrôle des caractères organoleptiques

Les propriétés organoleptiques regroupent tout ce qui est perceptible par les sens : aspect, couleur, odeur et toucher. L'examen macroscopique concerne également la recherche d'une opacité ou d'une texture particulière.

##### 2.2.6.2.2. Contrôle de l'homogénéité

Une certaine quantité de pommade est étalée sur une lame puis recouverte d'une lamelle pour une observation microscopique. Ce test permet d'apprécier l'homogénéité de la pommade.

##### 2.2.6.2.3. Evaluation de la stabilité et vieillissement accéléré

Les principaux phénomènes d'instabilité sont appréciés dans une éprouvette graduée par l'observation à intervalles de temps réguliers. La coalescence des gouttes ou le déphasage ont été recherchés par centrifugation à vitesse constante (4500 tr/mn pendant 30mn) [176].

#### 2.2.6.2.4. Détermination du pH

La mesure du pH est effectuée à l'aide d'une électrode introduit dans la pommade liquide avant refroidissement totale.

#### 2.2.6.3. Contrôle de la qualité microbienne des pommades dermiques

L'objectif de ce contrôle est d'apporter les moyens de vérifier que la pommade dermique réponde aux exigences microbiologiques spécifiées dans les monographies de la pharmacopée européenne.

Le principe de la technique est le dénombrement des germes viables totaux par la méthode de dénombrement sur plaque de gélose et la recherche des germes spécifiés [177].

##### 2.2.6.3.1. Dénombrement des germes viables totaux (mésophiles et champignons)

Pour réaliser cette technique, nous avons suivi les étapes suivantes :

###### 2.2.6.3.1.1. Protocole expérimental

La technique préconise des conditions d'asepsie rigoureuse d'où la stérilisation du laboratoire aux UV et les manipulations ont été réalisées sous une hotte à flux laminaire.

###### 2.2.6.3.1.2. Préparation de l'échantillon

La préparation des dilutions (1/10) s'effectue par dissolution de 10g ou 10ml de produit à examiner dans 90ml de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7, additionnée de Polysorbate 80 à une concentration de 1g/l.

###### 2.2.6.3.1.3. Examen des échantillons par dénombrement sur plaque de gélose (technique d'ensemencement en profondeur)

Après introduction de 1ml de chaque diluant de l'échantillon dans au moins (02) boites de pétri (9 cm de diamètre) par milieu et par dilution, nous rajoutons 15ml à 20ml de milieu gélosé liquéfié aux peptones de caséine et de soja (TSA), adapté à la culture des bactéries et un autre milieu gélosé liquéfié Sabouraud

(SAB), adapté à la culture des moisissures et levures à une température ne dépassant pas 45°C.

Nous incubons les boîtes de Pétri à 37°C pour les bactéries, à 25°C pour les moisissures et levures pendant 05 jours.

#### 2.2.6.3.1.4. Lecture

La sélection a été faite sur les boîtes correspondant à une dilution et présentant le plus grand nombre de colonies inférieur à 300 pour les bactéries et inférieur à 100 pour les levures et moisissures.

La moyenne arithmétique des dénombrements est prise et nous calculons le nombre d'UFC (unité formant une colonie) par gramme ou par millilitre de produit.

#### 2.2.6.3.2. Recherche des germes spécifiés

Dans le but de rechercher les entérobactéries, autres bactéries Gram négatifs et positifs. Le suivi des étapes suivantes est nécessaire :

##### 2.2.6.3.2.1. Recherche des entérobactéries et certaines autres bactéries Gram négatifs

Le produit à examiner est dilué à 1/10 dans un milieu nutritif (Bouillon lactosé) qui sera incubé à 37°C pendant 2 heures. Après agitation, nous prélevons 1ml de son contenu et l'inoculons à 10ml de milieu d'enrichissement MOSSEL, après une incubation à 37°C pendant 18 à 48h. Des subcultures seront effectuées sur milieu gélosé d'isolement VRBG (gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre). Ces dernières sont incubées à 37°C pendant 24h.

##### 2.2.6.3.2.2. Recherche d'*Escherichia coli*

La préparation du produit à examiner s'est faite, par dilution de 10 g de pommade dans 90 ml solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7 additionnée de polysorbate 80.

Un volume de 90 ml de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja estensemencé avec 10 ml de l'échantillon (correspond à 1 g ou 1 ml du produit). Après homogénéisation nous incubons à 37°C pendant 18-48 h.

Après agitation le transfert 1ml de son contenu est fait pourensemencer 100 ml de milieu liquide de Mac conkey, ensuite incubation à 45°C pendant 18-24 h. Des subcultures sont effectuées sur milieu gélosé Mac conkey ensuite incubation à 37°C pendant 18 à 72 h.

La croissance de colonies rouges, non mucoïdes, de bactéries Gram négatif en bâtonnets indique la présence possible d'*Escherichia coli* qui est confirmée par des tests biochimiques appropriés (production d'indole).

#### 2.2.6.3.2.3. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

Le produit à examiner est préparé par dilution de 10 g de pommade dans 90 ml de tampon pH 7. Une quantité de 10 ml de cet échantillon estensemencé avec 90ml de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja. Après homogénéisation nous incubons à 37°C pendant 48 h.

Des subcultures sont effectuées sur milieu gélosé cétrimide ensuite incubation à 37°C pendant 72 h.

#### 2.2.6.3.2.4. Recherche de *Stapylococcus aureus*

Un volume de 10 ml de l'échantillon estensemencé (préparé dans tampon phosphate pH 7) avec 90 ml de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja, après homogénéisation nous incubons à 37°C pendant 48h.

Des subcultures sont effectuées sur milieu gélosé Chapman et incubation à 37°C pendant 72 h.

La croissance de colonies jaune d'or de cocci Gram positif entourées d'une zone claire, indique la présence de *Staphylococcus aureus*. Ce résultat peut être confirmé par des tests biochimiques appropriés.



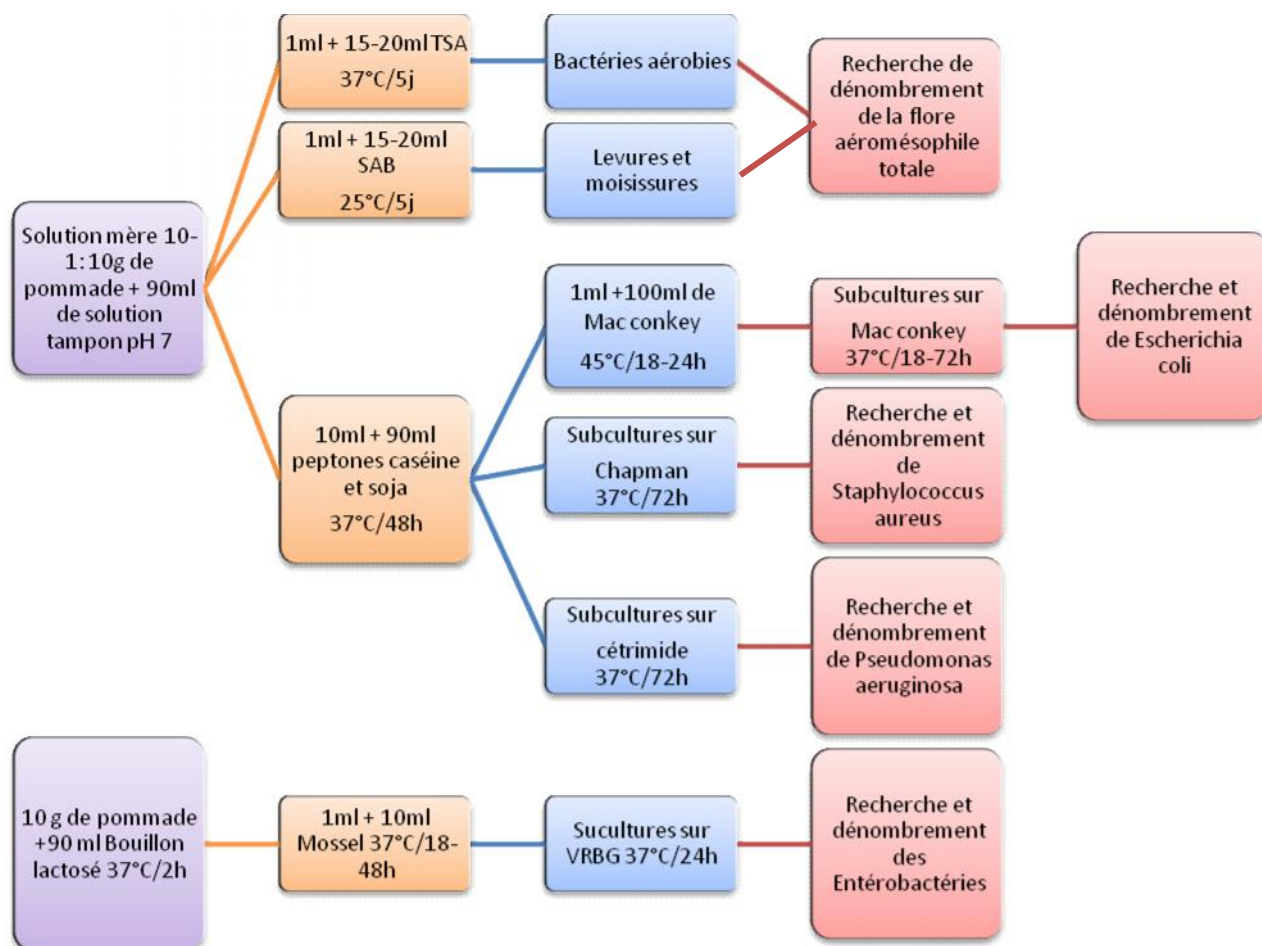


Figure 2.7 : Protocole d'analyse de la qualité microbienne.  
Monographies de la pharmacopée [177].

#### 2.2.6.3.2.5. Résultats

Le produit testé satisfait à l'essai ou conforme, s'il n'est pas observé de colonies types décrits ou si les tests biochimiques et sérologiques de confirmation sont négatifs (figure 2.7), [177].

### 2.2.7. Essais pharmaco-toxicologiques

Nous avons réalisé ces tests sur les lapins et les rats dans le but de montrer si la pommade n'est pas irritante aux concentrations préparées et qu'elle peut avoir un effet cicatrisant en comparant avec une pommade cicatrisante de référence qui est le Madécasol® (Centella asiatica), avec l'emploi préconisé chez l'homme.

#### 2.2.7.1. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée (IPC) de la pommade dermique

Nous avons réalisé cette technique en suivant les étapes suivantes :

##### 2.2.7.1.1. Principe

L'indice d'irritation primaire cutanée de la pommade testée a été déterminé chez le lapin selon une méthode de référence [178].

Le dos de chaque animal est divisé en deux zones après élimination des poils. Sur l'une des zones scarifiée, le produit est appliqué et reste en contact de la peau par un pansement pendant 24 heures. Des lectures sont faites une heure après enlèvement du pansement et deux jours après, soit 24 h et 72 h après l'application de la pommade.

Les lectures consistent à apprécier l'érythème et l'œdème selon une échelle numérique notée de 0 à 4. La détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée IP se fait par l'addition des chiffres obtenus pour l'érythème et l'œdème à chaque temps de lecture (24 et 72 heures après l'application) et pour chacune des zones. Les chiffres ainsi obtenus sont additionnés, ce total est divisé par 24, la moyenne ainsi obtenue représente l'IP [178].

##### 2.2.7.1.2. Protocole

Nous avons tondu soigneusement les flancs de 6 lapins néozélandaises Albinos (2,5 à 3 kg) la veille de l'application (Figure 2.8). Un flanc servira de côté témoin, l'autre flanc servira de côté essai. Nous avons scarifié à l'aide d'une aiguille (ou scalpel) le flanc essai par 3 incisions parallèles de 3 cm de long espacées d'environ 0,5 cm. Vingt-quatre heures plus tard, une quantité de 0,5g de

pommade testée a été appliquée (pommade à 2% d'HE des trois concentrations préparées) sur le flanc essai.



Figure 2.8 : Flanc de lapin rasé et scarifié (Original, 2010).

#### 2.2.7.1.3. Lecture

La lecture a été faite 24 h plus tard puis 72 h après l'application. L'évaluation de l'IPC s'est portée sur la formation de l'érythème et l'œdème qui sont notés suivant l'échelle numérique (Tableau 2.4).

La détermination de l'indice d'irritation I aire cutanée s'est faite par la formule suivante :  $IPC = \text{Somme des valeurs de l'érythème et de l'œdème} / 24$  (24 = nombre de lapins (6) x nombre de zones testées (traité et témoin = 2) x nombre de type d'irritation (œdème et érythème = 2).

Selon la gravité des effets observés, les produits sont classés en non irritants ( $IPC < 0,5$ ), légèrement irritants ( $0,5 < IPC < 2$ ), irritants ( $2 < IPC < 5$ ) et sévèrement irritants ( $5 < IPC < 8$ ) [178].

Tableau 2.4 : Evaluation de la tolérance cutanée in vivo [178].

Echelle	Erythème et formation d'escarres	Evaluation de l'œdème
0	Pas d'érythème	Pas d'œdème
1	Léger érythème (à peine visible)	Œdème très léger (à peine visible)
2	Erythème bien visible	Léger œdème (contours bien définis, gonflement apparents)
3	Erythème modéré à important	Œdème moyen (épaisseur 1mm)
4	Erythème grave (rouge pourpre) avec ou sans escarres	Œdème grave (épaisseur > 1mm)

#### 2.2.7.2. Etude de la cicatrisation de plaies in vivo de la pommade dermique

Les étapes suivantes sont nécessaires pour effectuer la technique préconisée.

##### 2.2.7.2.1. But et principe

Nous avons choisi de définir l'activité cicatrisante en réalisant des tests spécifiques plus adaptés à l'évaluation du processus. Pour cela, nous avons réalisé in vivo chez des rats Whistar Albinos un test aboutissant à la création artificielle de blessures plus ou moins importantes permettant ainsi une quantification plus complète des paramètres retenus et ceci par application d'une pommade à base d'HE (0,5, 1 et 2%) d'*Origanum floribundum*, la lecture des résultats a été faite en comparaison avec :

- Un groupe recevant un produit de référence (Asiaticoside 1%- principe actif du Madécassol®, sous forme d'onguent.
- Un groupe traité par l'excipient exempt de principe actif (lot placebo).
- Un groupe ne recevant aucun traitement (lot témoin négatif).

##### 2.2.7.2.2. Méthodologie

Nous avons utilisé pour ce test 4 lots de 5 rats Whistar mâles et femelles de 200 g environ selon la méthode préconisée par Pourrat et *al.*, [179]. Deux plaies circulaires et symétriques de 5mm de diamètre sont réalisées de part et d'autre de

l'axe vertébral de l'animal à l'aide d'une poinçonneuse à main, après avoir préalablement rasés les deux flancs (Figure 2.9). Cette méthode consiste à anesthésier et à calmer au préalable les animaux avec de la kétamine + Acépromazine en dose 2 ml/kg. Nous avons administré aseptiquement et respectivement 0,5ml + 0,2ml par voie intramusculaire (Appendice C9).

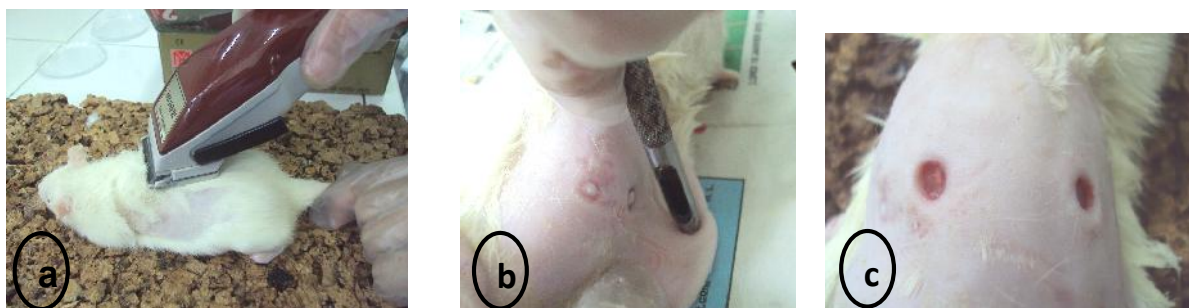


Figure 2.9 : Préparation de l'animal (le rat).  
(Original, 2010).

- a : rasage du rat
- b : outil servant au poinçonnage
- c : les cicatrices symétriques et circulaires (5 mm)

- ✓ 1<sup>er</sup> lot : la plaie gauche ne reçoit aucun traitement alors que sur la plaie droite est appliqué à l'excipient (E).
- ✓ 2<sup>ème</sup> lot : la plaie gauche reçoit la substance de référence (Madécassol® 1%), alors que la plaie droite est traitée avec la pommade à l'HE d'*origanum floribundum* 0,5%.
- ✓ 3<sup>ème</sup> lot : la plaie gauche reçoit la substance de référence, alors que la plaie droite est traitée avec la pommade à l'HE d'Origan à 1%.
- ✓ 4<sup>ème</sup> lot : la plaie gauche reçoit la substance de référence, alors que la plaie droite est traitée avec la pommade à l'HE d'Origan à 2%.

Les produits sont appliqués quotidiennement pendant 14 jours. L'observation macroscopique est réalisée avant chaque nouvelle application dans des conditions expérimentales précises, à l'aide d'une loupe ordinaire avec éclairage artificiel en immobilisant l'animal sur la paille.

Chaque animal est placé dans une cage individuelle. Il reçoit une nourriture sous forme de granulées (Appendice E) et de l'eau durant tout le traitement jusqu'à la cicatrisation totale.

Cinq paramètres sont retenus pour évaluer le déroulement du processus de cicatrisation :

- La surface de la plaie.
- La profondeur de la plaie.
- L'apparition ou non d'un œdème.
- L'apparition ou non d'un bourgeon.
- L'épaisseur de la croûte et son renouvellement.

Nous avons pris une échelle de cotation [179], afin de suivre l'évolution du processus de cicatrisation en tenant compte de 4 paramètres, chacun de ces derniers a reçu une valeur numérique de 0 à 4, définie selon le tableau 2.5.

Tableau 2.5 : Suivi du processus de cicatrisation.

Echelle de cotation Pourrat [179]	Profondeur	Bourgeon	Œdème	Epaisseur de la croûte
0	Profondeur nulle	Absence de bourgeon	Pas d'œdème	Pas de croûte
1	Légèrement creusé	Petit bourgeon	Très léger œdème	Début de croûte
2	Peu profond	Gros bourgeon central	Œdème visible	Croûte en voie d'épaississement
3	Assez profond	Bourgeonnement massif	Œdème moyen	Croûte épaisse
4	Très profond	Excès de bourgeonnement	Œdème grave	Croûte très épaisse, granuleuse et bombée

La surface de la plaie est exprimée en mm<sup>2</sup> à partir du diamètre mesuré perpendiculairement à l'axe vertébral à l'aide d'un compas [179].

### 2.2.8. Analyse statistique

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum* ont été soumis à une analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1). Par contre les résultats de l'activité antioxydante d'HE et activité cicatrisante de la pommade à base d'HE ont été soumis à une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA 2), avec un niveau de signification de 0,05 en utilisant le logiciel statistique SPSS 17.0.

## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Etude botanique d'*Origanum floribundum* Munby

Une observation macroscopique et microscopique, nous ont permis de décrire les organes de la plante étudiée.

##### 3.1.1. Etude macroscopique de la fleur

Les fleurs de l'origan sont groupées en panicule (corymbe) au sommet de la tige et des rameaux (figure 3.1). Elles sont entourées de bractées ovales vertes à rouges violettes, portées par un pédoncule de couleur rouge.

La fleur est hermaphrodite et actinomorphe. Elle est de petite taille environ 5 mm de longueur. Elle possède des pétales de couleur rose et au nombre de 5. Elles sont plus grandes que les sépales, présentant des extrémités arrondies.

Nous avons noté la présence de vésicules de couleur jaune d'or. Ce sont les poils sécréteurs d'HE appelés trichomes et des poils tecteurs qui sont présents également au niveau des sépales et recouvrant tout le calice, bractées et pédoncule. Les sépales sont disposés en 5 dents pointues et courtes (figure 3.2).

Le nombre d'étamines est de 4 disposées sur deux verticilles. Les étamines inférieures sont un peu plus longues. Nous avons noté aussi la présence de trichomes mais pas de poils tecteurs (figures 3.3 et 3.4).

L'ovaire est supère, le carpelle possède également un style, un seul stigmate et de trichomes avec absence de poils tecteurs (figure 3.5). Le fruit sec libère 4 akènes qui ont une couleur marron foncé et qui sont tapissés de trichomes et poils tecteurs (Figure 3.6).



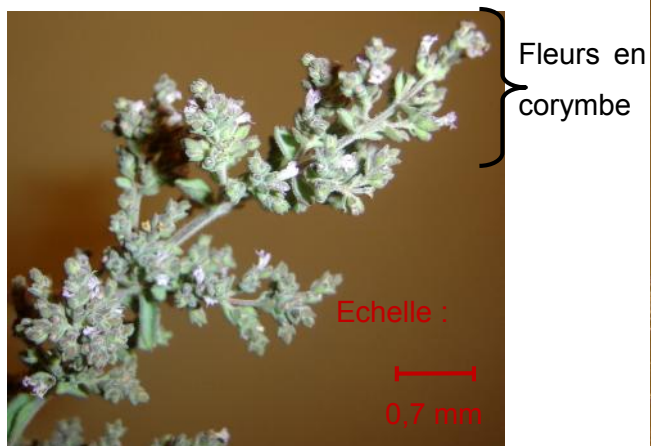


Figure 3.1 : Inflorescences réunies en Corymbe (Original, 2010).

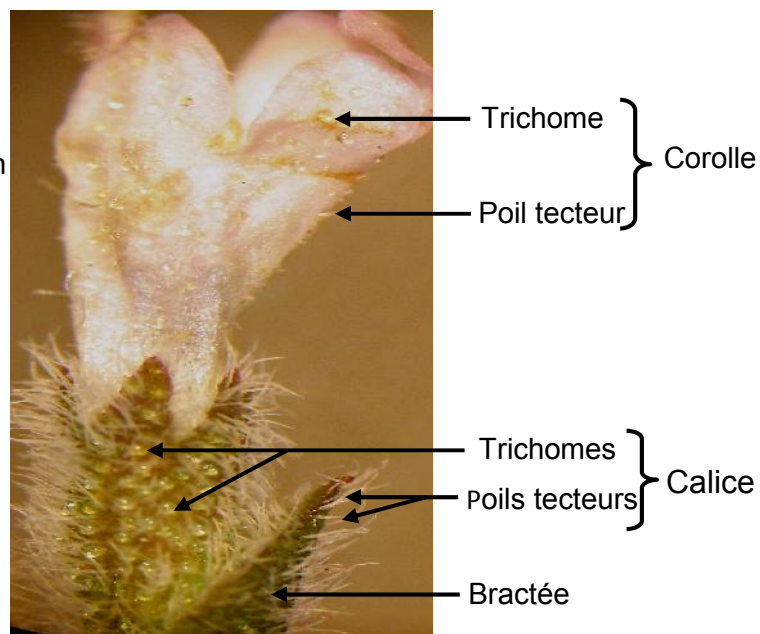


Figure 3.2 : Présence des trichomes et poils tecteurs au niveau du périgone, (G x 4,5) (Original, 2010).

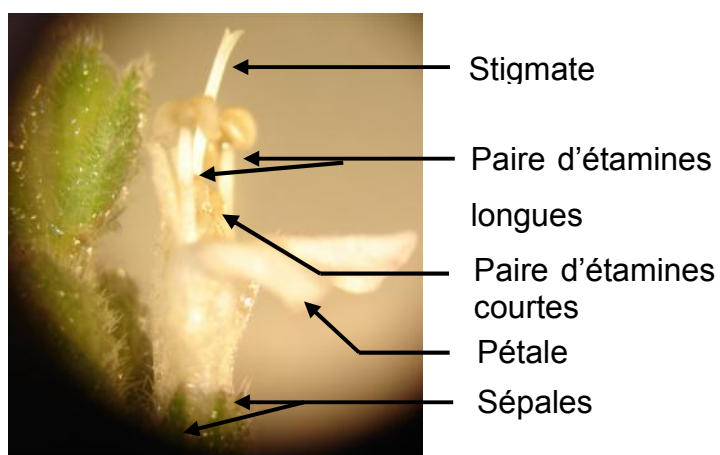


Figure 3.3 : Disposition des étamines (G x 4,5) (Original, 2010).

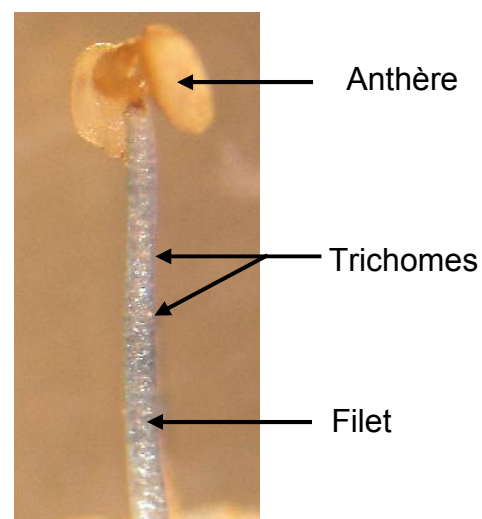


Figure 3.4 : Etamine (G x 10) (Original, 2010).

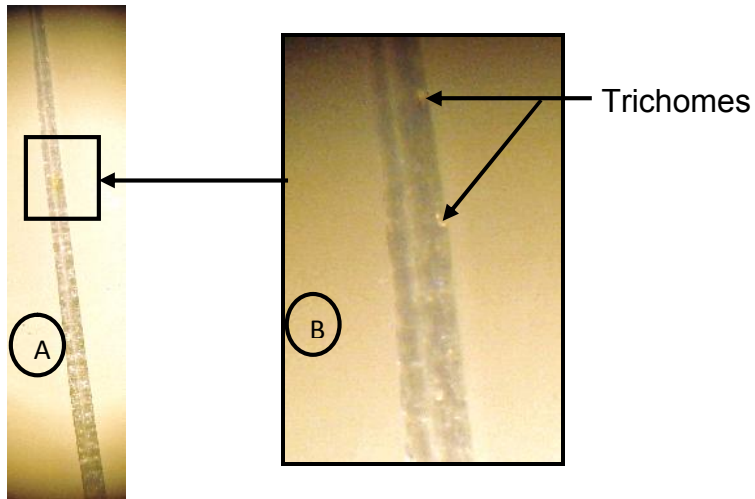


Figure 3.5 : Présence de trichomes au niveau du Carpelle observés à la loupe, (G x 4,5 (A) et G x 10 (B)) (Original, 2010)

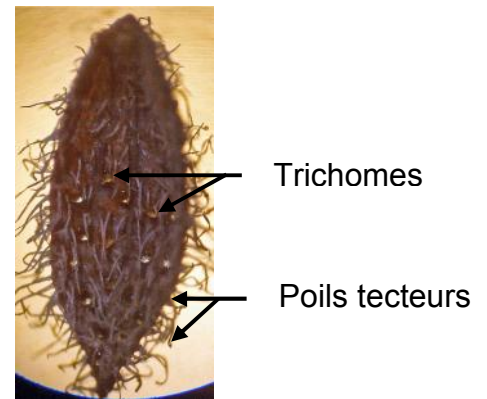


Figure 3.6 : Akène tapissé de poils tecteurs et trichomes, (G x 10) (Original, 2010).

### 3.1.2. Etude macroscopique de la feuille

Elle est ovale, pétiolée, son extrémité est légèrement pointue et elle est tapissée de poils tecteurs et trichomes. Les poils sont plus nombreux sur la face inférieure de la feuille (figures 3.7 et 3.8).

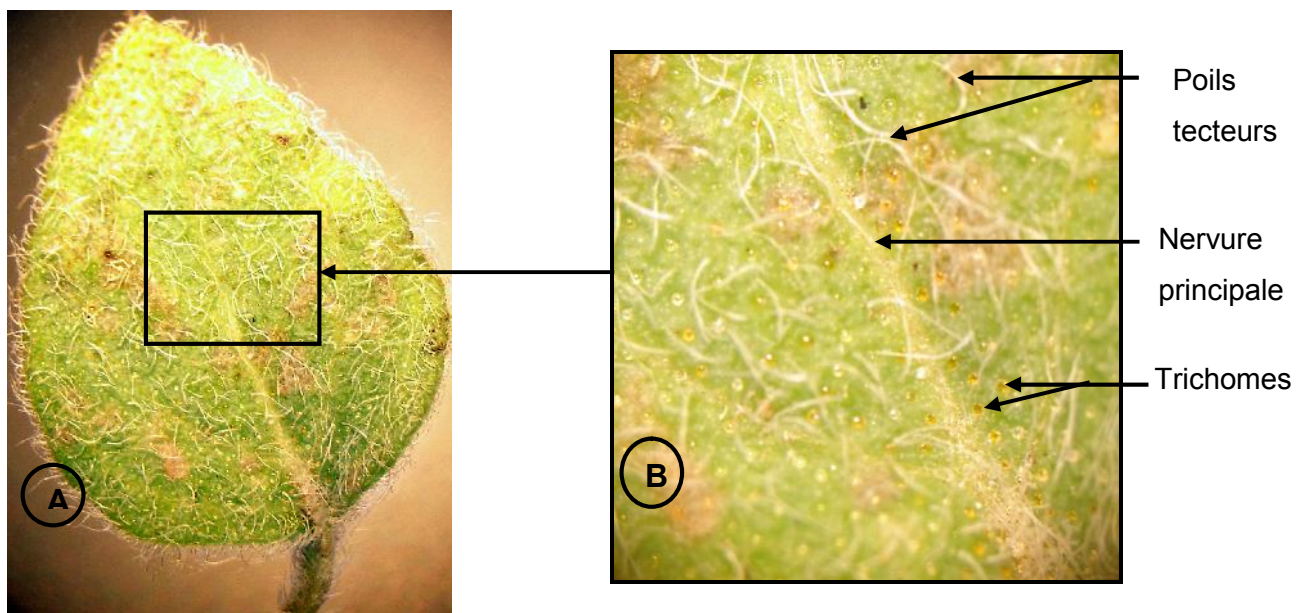


Figure 3.7 : Présence des trichomes et poils tecteurs sur la face supérieure de la feuille observés à la loupe (G x 2,5 (A) et G x 4,5 (B)) (Original, 2010).

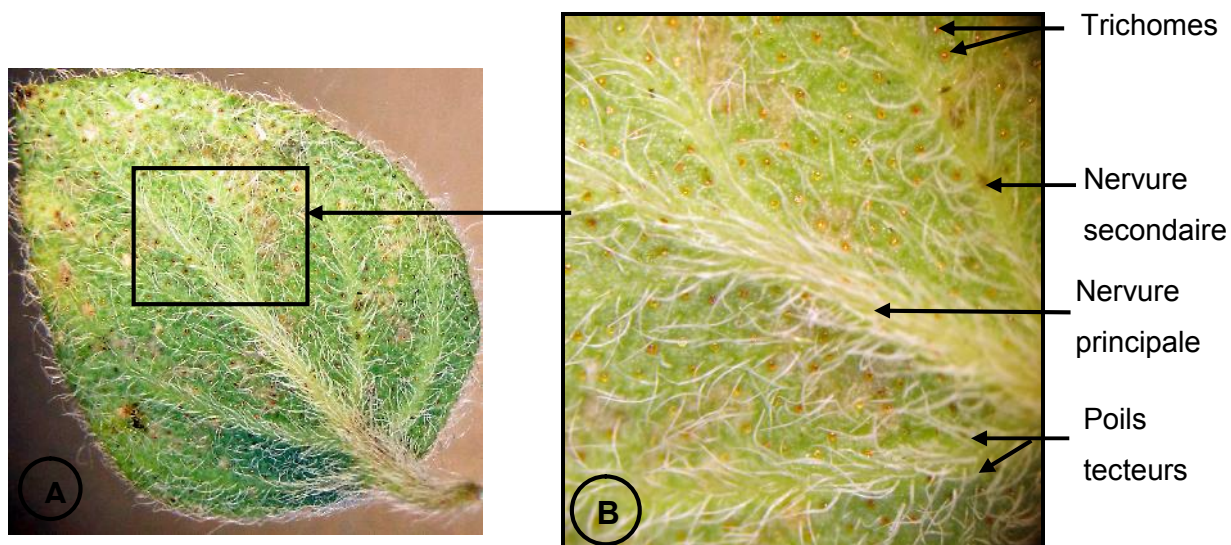


Figure 3.8 : Présence des trichomes et poils tecteurs sur la face inférieure de la feuille observés à la loupe G x 2,5 (A) et G x 4,5 (B) (Original, 2010).

### 3.1.3. Etude macroscopique de la tige

La tige a une longueur de 40 à 70 cm de longueur. Elle est rougeâtre et semi-ligneuse à la base et herbacée vers le sommet. Sous la loupe, nous avons noté la présence d'un tapis de poils tecteurs et de quelques trichomes (figure 3.9).

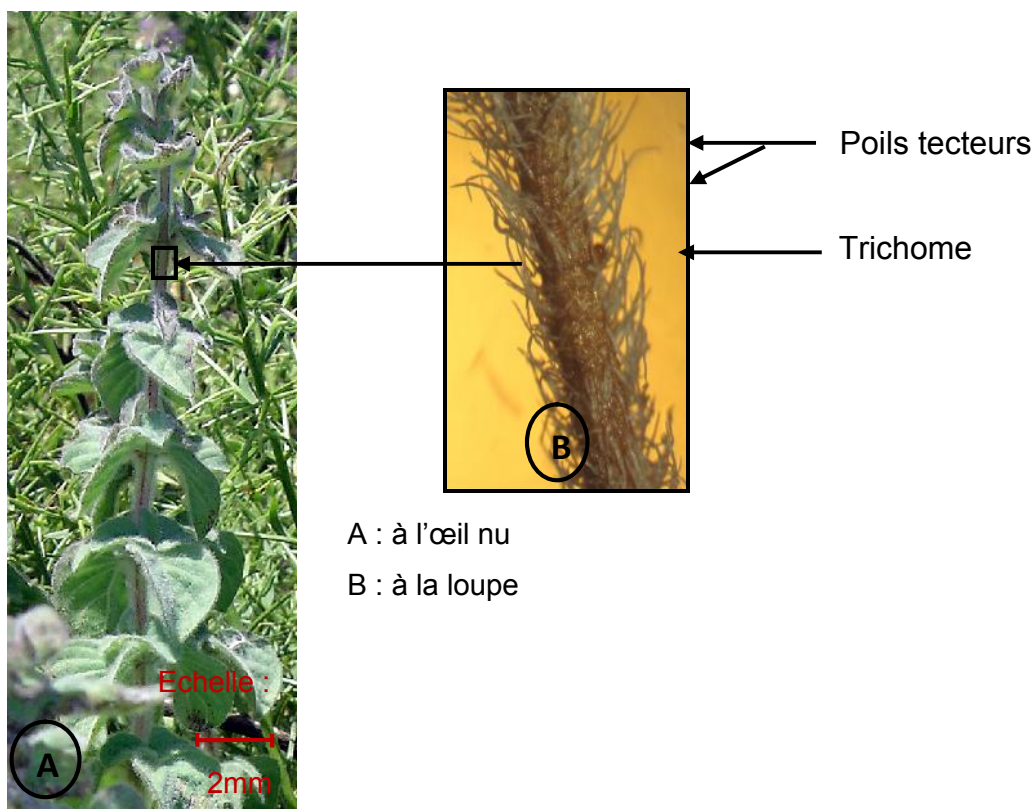


Figure 3.9 : Présence de poils tecteurs et peu de trichomes sur la tige observés à l'œil nu puis à la loupe (G x 2,5) (Original, 2010).

Les travaux d'étude botanique réalisés sur l'Origan de la méditerranée [180], montrent que les trichomes sont présents au niveau des organes végétatifs, mais leur nombre diminue au niveau des organes reproducteurs et sont absents au niveau des étamines et carpelles. Nos observations ont révélé la présence de trichomes glandulaires sur tous les organes, les fleurs, les feuilles et les pétioles. La présence des sites sécréteurs d'HE d'*Origanum floribundum* sur carpelle et étamine est bien visible par observation à la loupe (Figures 3.4 et 3.5).

#### 3.1.4. Etude microscopique de la tige

La forme de la coupe est de section carrée très fréquente chez les labiacées [164]. Les coupes transversales de la tige à main levée (Figures 3.10, 3.11 et 3.12) et au microtome (Figures 3.13 et 3.14), montrent les tissus suivants de l'extérieur à l'intérieur :

- Écorce

Le Suber qui est tissu secondaire constitué de deux à cinq couches de cellules alignées en fil radiale. Nous avons noté la présence de nombreux poils tecteurs pluricellulaires et quelques trichomes contenant de l'HE (Figures 3.11 et 3.12).

Le parenchyme cortical est formé de cinq à six assises de cellules plus ou moins arrondies. Quand au collenchyme, il est formé de cellules épaisses pecto-cellulosique occupant chaque coin et se prolonge souvent en une seule couche sous-épidermique.

- cyindre centrale

Il est formé par un tissu de soutien dont les cellules sont mortes en l'occurrence, les fibres de sclérenchyme qui entourent complètement les tissus conducteurs ou tissus cribro-vasculaires. Ces derniers sont formés par un anneau de deux ou trois assises de cellules, présentent des parois lignifiées.

Le phloème est un tissu qui conduit la sève élaborée. Sur les coupes, nous le distinguons disposé en bande continue vers l'extérieur appelé Liber. Il est constitué de petites cellules arrondies vivantes, dont les parois sont pectocellulosiques.

Le xylème est un tissu qui conduit la sève brute. Nous le distinguons sur les coupes effectuées vers l'intérieur, représenté par le bois hétéroxylé. Il est constitué de cellules dont les parois présentent un épaissement ligneux, c'est un tissu mort.

La Moelle est creuse et importante composée de parenchyme de stockage, ou peut être absente ce qui est assez fréquent.

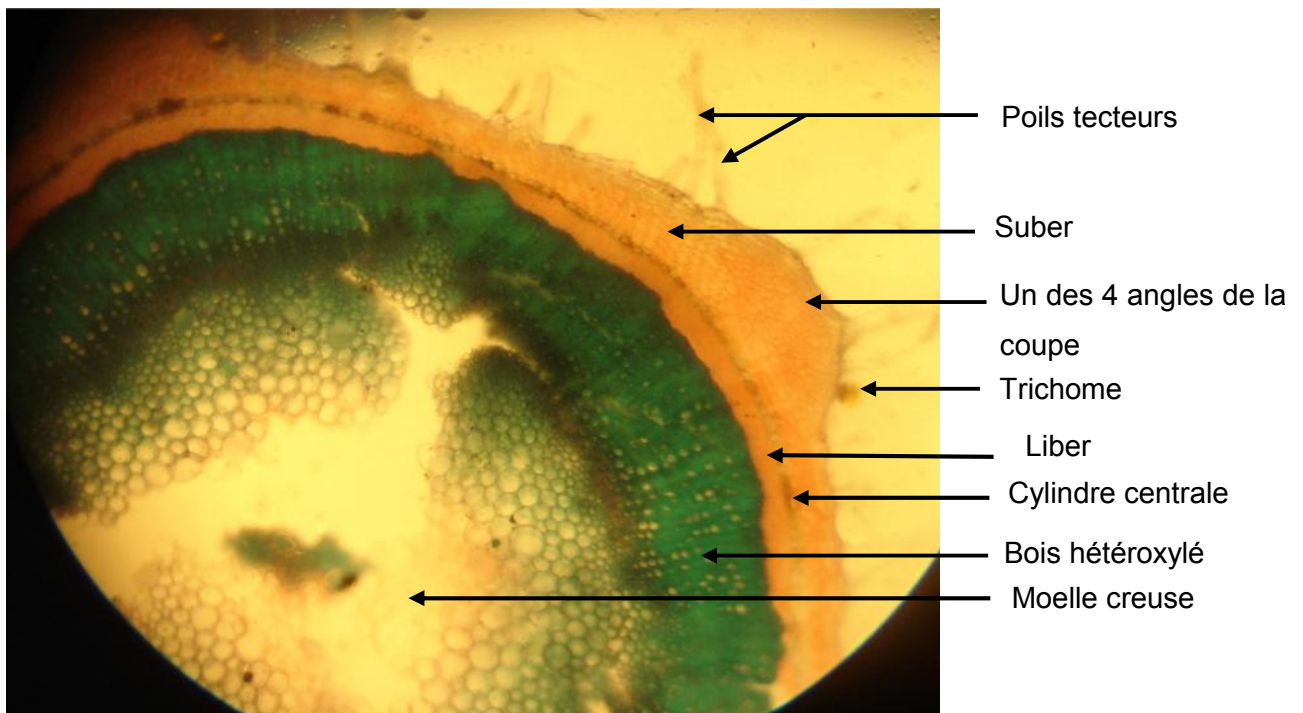


Figure 3.10 : Coupe transversale de la tige d'*Origanum floribundum*  
(à main levée et par double coloration G x 100)

(Original, 2010).

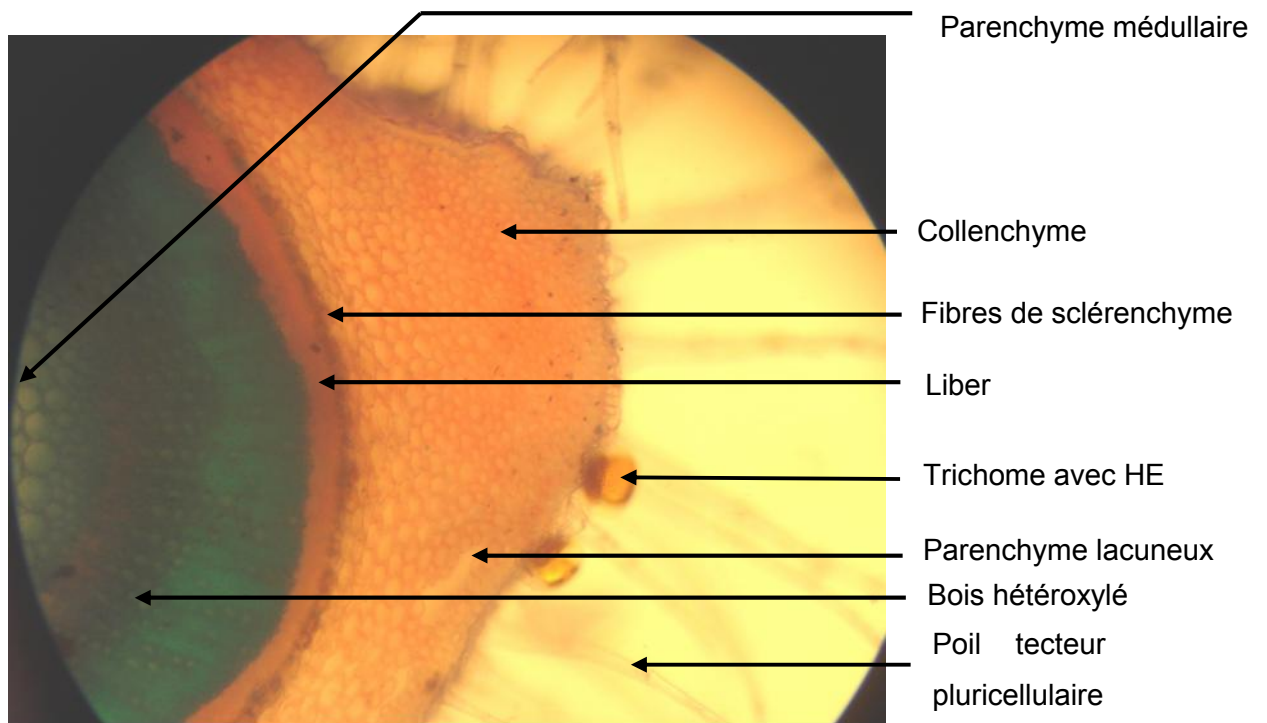


Figure 3.11 : Coupe transversale de la tige d'*Origanum floribundum* à main levée et par double coloration (G x 200) (Original, 2010).

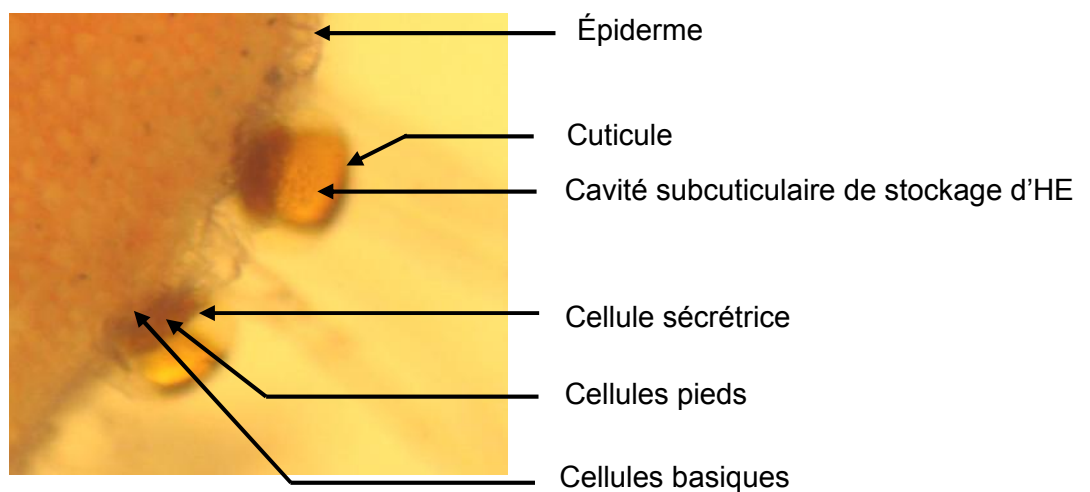


Figure 3.12 : Coupe transversale de la tige d'*Origanum floribundum* représentant les trichomes à main levée et par double coloration (G x 400) (Original, 2010).

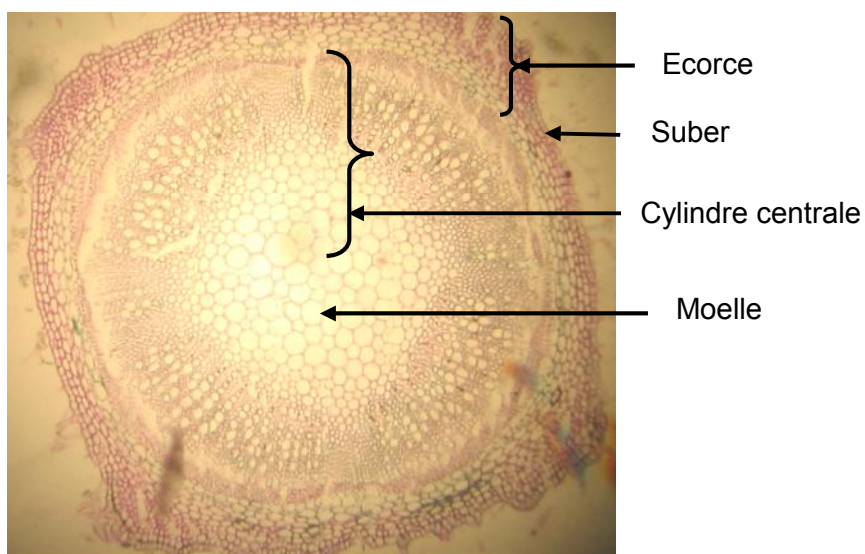


Figure 3.13 : Coupe transversale de la tige d'*Origanum floribundum*  
 au microtome et par double coloration (G x 100)  
 (Original, 2010).

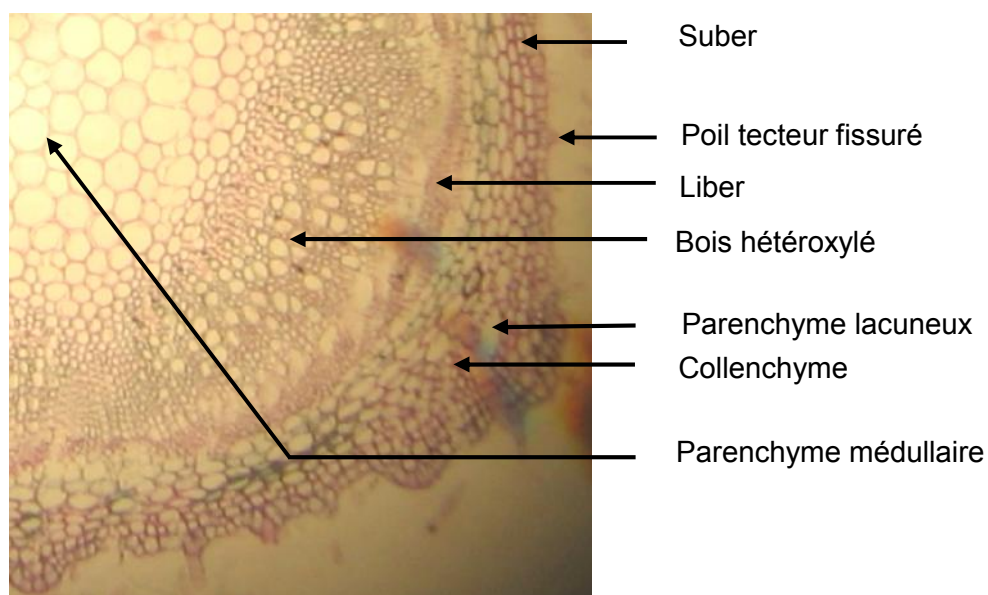


Figure 3.14 : Coupe transversale de la tige d'*Origanum floribundum*  
 au microtome et par double coloration (G x 200)  
 (Original, 2010).

### 3.1.5. Etude microscopique de la feuille (coupes à main levée et au microtome)

Les coupes transversales à main levée montrent que la feuille est un organe aplati. Elle présente une symétrie bilatérale. La nervure principale ou médiane est apparente (Figure 3.15).

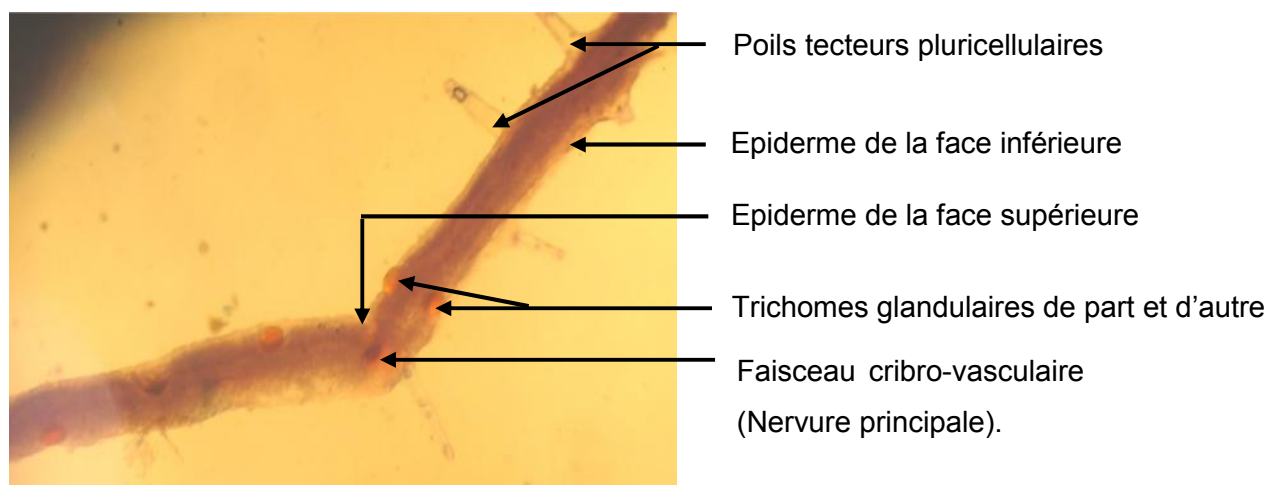


Figure 3.15 : Coupe transversale d'une feuille d'*Origanum floribundum*  
(à main levée et par double coloration G x 100) (Original, 2010).

L'épiderme supérieur et inférieur sont formés d'une monocouche épidermique, recouverte d'une cuticule vers l'extérieur et les poils tecteurs pluricellulaires ainsi que de nombreux trichomes. Vers l'intérieur nous retrouvons le parenchyme palissadique formé de monocouche de cellules longues (3.16). Les cellules sont rondes et forment le parenchyme lacuneux vers l'intérieur (3.17).

Au niveau de la nervure principale, nous retrouvons le faisceau conducteur formé de Liber (du côté de l'épiderme de la face inférieure) et Bois (vers l'épiderme de la face supérieure). Il est recouvert de collenchyme des deux côtés.

En effectuant nos coupes à main levée au niveau de la feuille, nous n'avons pas pu réaliser des coupes au niveau du pétiole.



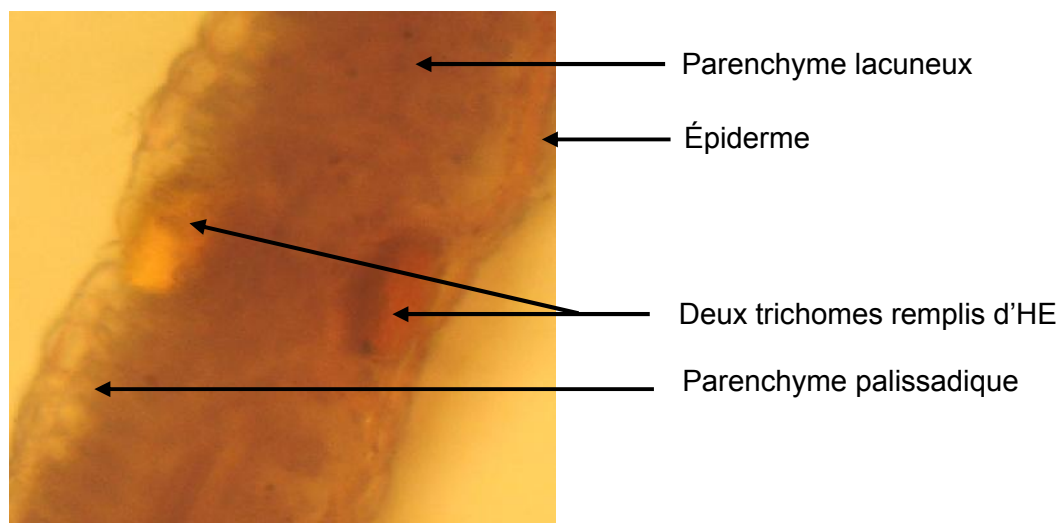


Figure 3.16 : Coupe transversale d'une feuille d'*Origanum floribundum*  
à main levée et par double coloration (G x 200)  
(Original, 2010).

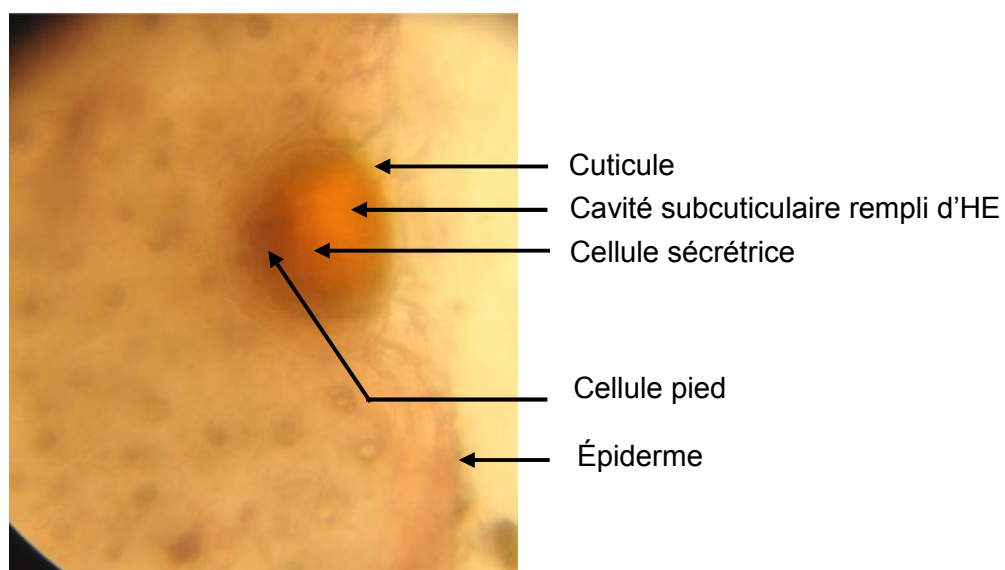


Figure 3.17 : Coupe transversale d'une feuille d'*Origanum floribundum*  
à main levée et double coloration montrant le trichome (G x 400)  
(Original, 2010).

Les coupes au microtome nous ont permis d'observer de façon précise les tissus de la plante difficile à avoir avec des coupes à main levée (déchirure tissulaire très fréquente) (Figure 3.18, 3.19 et 3.20).

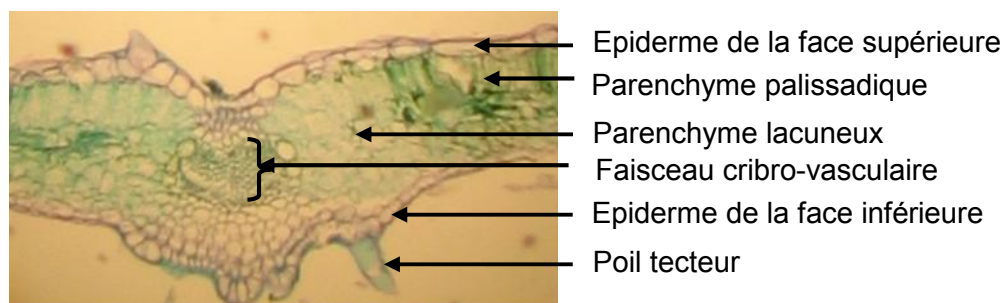


Figure 3.18 : Coupe transversale d'une feuille d'*Origanum floribundum* sur la nervure principale au microtome et par double coloration (G x 100)

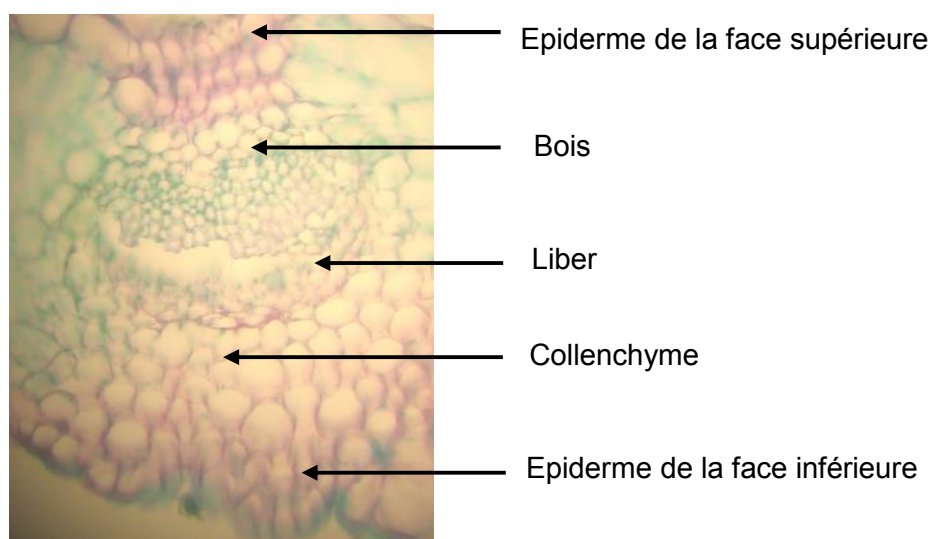


Figure 3.19 : Coupe transversale d'une feuille d'*Origanum floribundum* sur la nervure principale au microtome et par double coloration (G x 200)  
(Original, 2010).

Le problème sur les coupes au microtome est que ces dernières perdent complètement l'HE des trichomes glandulaires. Nous ne retrouvons plus de trichomes au niveau des tiges et pétioles, comparées aux coupes réalisées à main levée. Cette perte est sûrement due au trempage des coupes dans des bains de solvants et alcools qui rendent les tissus externes fragiles et les HE solubles.

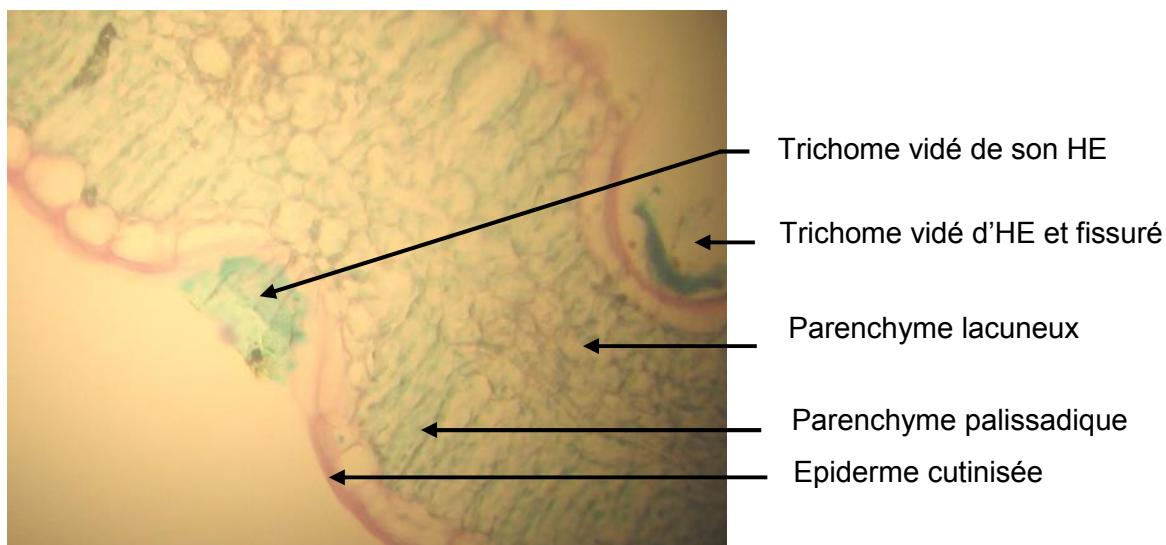


Figure 3.20 : Coupe transversale d'une feuille d'*Origanum floribundum* au microtome et par double coloration (G x 200) (Original, 2010).

Nous avons aussi réalisé des coupes transversales au niveau de la base de la feuille et du pétiole (Figure 3.21 et 3.22).

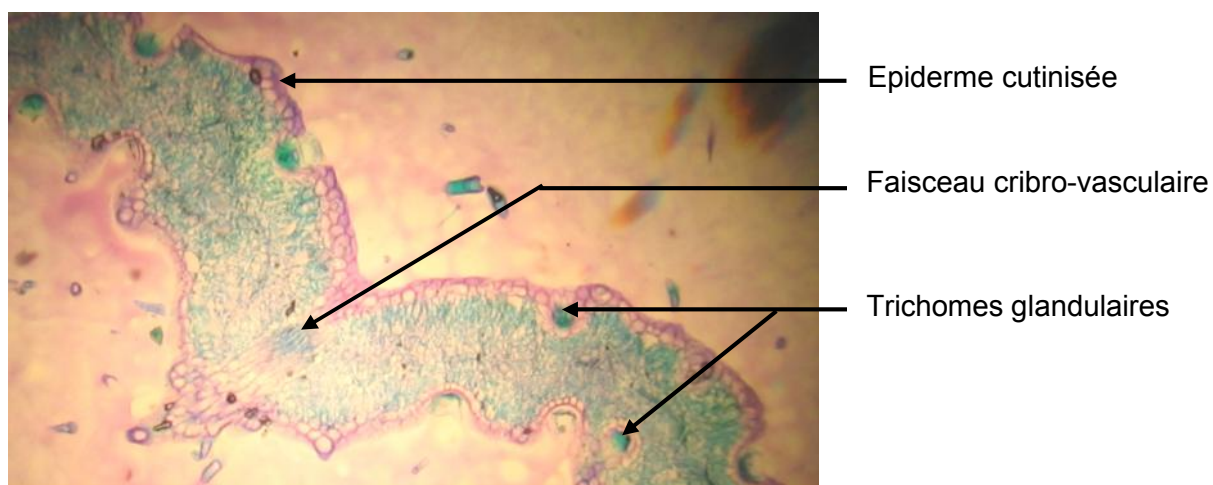


Figure 3.21 : Coupe transversale au niveau de la base de la feuille d'*Origanum floribundum* au microtome et double coloration (G x 100), (Original, 2010).

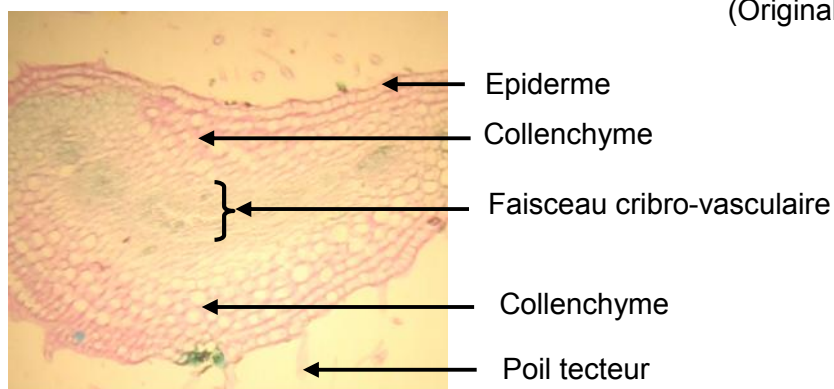
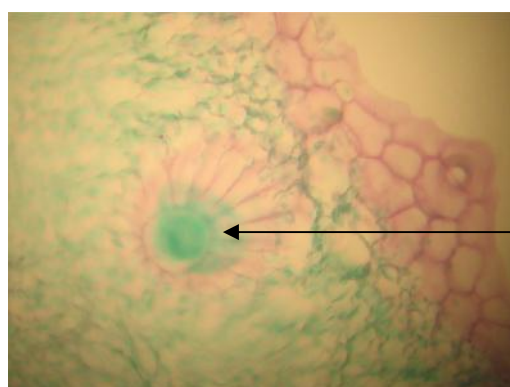
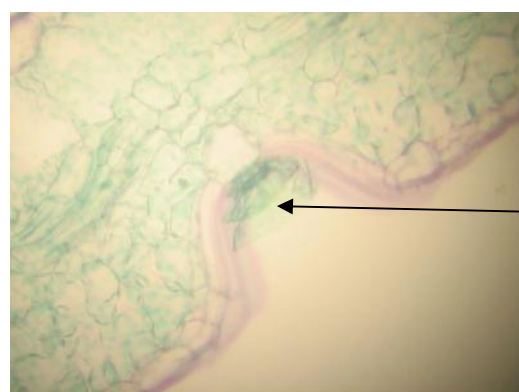


Figure 3.22 : Coupe transversale d'un pétiole d'*Origanum floribundum* au microtome et double coloration (G x 100), (Original, 2010).

Les coupes au microtome, nous ont permis de montrer l'aspect des trichomes glandulaires au niveau des feuilles (vue de profil et de surface). Le trichome est en forme de rosette. Cette description est décrite par plusieurs travaux [181] et [90] (figure 3.23 et 3.24).



Forme  
rosette du  
trichome  
glandulaire



Trichome  
glandulaire

Figure 3.23 : Coupe longitudinale de la feuille d'*Origanum floribundum* au microtome montrant un trichome glandulaire (vu de face), (G x 200) (Original, 2010).

Figure 3.24 : Coupe transversale de la feuille d'*Origanum floribundum* au microtome montrant un trichome glandulaire (G x 200), (Original, 2010).

Notre étude macroscopique et microscopique nous a confirmé que les sites sécréteurs d'HE sont les trichomes glandulaires. Ils sont présents en surface des épidermes des organes végétatifs et reproducteurs d'*Origanum floribundum*.

Nous avons remarqué que leur abondance sur les feuilles et les fleurs est nettement supérieure. Ces résultats rejoignent les travaux de Werker et Ravid [180].

### 3.2. Extraction et rendement en huile essentielle

Nous avons pu récupérer une quantité de 133,5 ml d'HE à partir de 10,5 kg de plantes sèches, par décantation et élimination de l'hydrolat.

Cependant, ce rendement en HE est relativement moyen (1,21%) comparé à celui rapporté par Baser et al., [181] qui est de 0,66% pour *Origanum floribundum* de Chréa Blida. Le rendement obtenu est inférieur à celui cité par Hazzit et al.,

[85] qui est de 2,9%. Houmani et *al.*, [182] mentionnent que le rendement, pour la même espèce étudiée et la même méthode préconisée est de 3,1%, qui est plus que le double du rendement obtenu.

En effet, ce rendement peut être influencé par des paramètres intrinsèques (étapes de croissance) et extrinsèques comme (conditions pédoclimatiques et méthodes d'extraction [183]). Les facteurs abiotiques influençant ce rendement en HE sont la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents.

Le vent exerce une influence directe chez les espèces qui possèdent des structures histologiques superficielles de stockage (cas de l'Origan).

### 3.2.1. Détermination du taux d'humidité de la matière végétale

Le taux d'humidité a été déterminé pour *Origanum floribundum* à l'état frais et sec, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Taux d'humidité de la matière végétale.

	La quantité d'eau dans la matière végétale (ml)	Le taux d'humidité(%)
Origan frais	5,3	52,89
Origan sec	1,32	11,98

Nous remarquons que la plante n'est pas très riche en eau de part sa constitution physiologique. Après séchage de la plante, il y'a eu élimination du ¼ d'eau. Nous avons séché la plante à l'air libre à température  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , durant trois semaines jusqu'à stabilité du poids [60].

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 [90].

### 3.2.2. Résultat de la cinétique d'extraction

Cette étude nous a permis de suivre la cinétique d'extraction et l'évolution du rendement en HE en fonction du temps. Elle est présentée dans la figure 3.25.

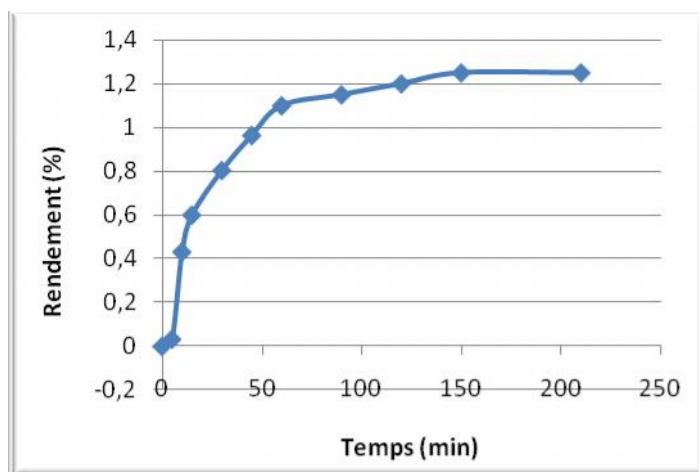


Figure 3.25 : Cinétique d'extraction de l'HE d'*Origanum floribundum*.

La courbe de la cinétique d'extraction des HE se caractérise par une partie ascendante où la majeure partie de l'huile extraite correspond à un temps de 90 minutes. L'allure de la courbe représentée présente trois étapes :

- La première étape est caractérisée par une augmentation rapide de l'extraction au bout de 60 minutes pour atteindre un rendement de 1,10% (g/100g de matière végétale sèche). cela peut s'expliquer par un entraînement massif de l'HE située sur la surface du végétal par la vapeur produite, où 90% de l'HE totale a été récupérée.
- Durant la deuxième étape (60-120) minutes, nous constatons un ralentissement de l'extraction par rapport à l'étape précédente où le taux d'extraction diminue jusqu'à 1% de la valeur de la quantité globale recueillie. Ceci s'explique par une hydrodiffusion lente de l'HE qui est restée piégée dans les organes sécréteurs de la matière végétale.
- La dernière étape correspondant à la stagnation du rendement. Elle indique la fin de l'extraction. Elle nous permet aussi de déduire une durée maximale égale à 120-180 minutes pour avoir un maximum de rendement sans abus d'énergie.

Après deux heures d'extraction, nous avons récupéré la totalité d'HE qui était emmagasinée au niveau des trichomes glandulaires d'*Origanum floribundum*.

### 3.3. Caractérisation de l'HE

Nous avons déterminé les caractéristiques organoleptiques, indices physico-chimiques ainsi que l'analyse qualitative et semi-quantitative de l'HE d'Origan par CG/SM comme suit :

#### 3.3.1. Caractéristiques organoleptiques

L'HE d'Origan a une odeur caractéristique, aromatique, phénolique, agréable avec un fond légèrement épicé (AFNOR, 2000) [18] (tableau 3.2).

Tableau 3.2 : Caractères organoleptiques de l'HE *d'Origanum floribundum* [18].

Espèce	Aspect	Couleur	Odeur	Flaveur
<i>Origanum floribundum</i>	Liquide limpide, mobile	Jaune pâle	Fortement aromatique	Phénolique épicée et amère
<i>Origanum</i> type Espagne (AFNOR, 2000)	Liquide mobile, limpide	Jaunâtre à brun foncé	Caractéristique, aromatique	Phénolique épicée

Les paramètres organoleptiques de l'HE étudiée sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR (2000) [18].

#### 3.3.2. Indices physico-chimiques

Nous avons déterminé les constantes physico-chimiques selon des méthodes normalisées (AFNOR, 2000) [18]. Les résultats de ces mesures sont regroupés dans le tableau 3.3.

Tableau : 3.3 : Caractères physico-chimiques de l'HE *d'Origanum floribundum*

Paramètres physico-chimiques						
	Indice d'Acide	Indice d'Ester	Densité à 20°C	Indice de Réfraction	Pouvoir rotatoire	Miscibilité à l'éthanol à 70°
Résultats obtenus	2,51	26	0,88	1,48	0,24°	1v/4v
Normes AFNOR (2000)	/	/	0,93-0,95	1,50-1,51	-5°et +2°	1v/4v

Nous remarquons que les paramètres physico-chimiques des HE sont en accord avec ceux mentionnés par les normes d'AFNOR, (2000) [18].

L'indice d'acide (IA) montre le taux des acides gras libres dans l'HE. Une valeur élevée indique une dégradation d'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation. Inversement, un IA inférieur à 2 est un indice de bonne conservation de l'HE [184]. L'IA obtenu est de 2,5, cette valeur mentionne que l'HE obtenue est stable et ne provoque pas d'oxydation inquiétante (bonne conservation d'HE extraite).

Les faibles indices de réfraction des HE (1,47-1,49) indiquent leur faible réfraction de la lumière. Cette constatation confirme nos résultats, ce qui pourrait favoriser leur utilisation dans les produits cosmétiques [185].

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure insuffisante pour caractériser l'HE. Il est primordial de déterminer le profil chromatographique de l'HE qui est l'identité de l'HE.

### 3.3.3. Analyses qualitative et semi-quantitative des HE d'*Origanum floribundum* par CPG/SM

L'identification des composés de l'HE par CG/SM a été essentiellement basée sur la comparaison des spectres de masse de la molécule inconnue à celui d'un composé pur fourni par la base des données informatiques [23].

Le chromatogramme de la figure 3.26 et le tableau 3.4 résument l'ensemble des composés identifiés ainsi que leurs proportions.



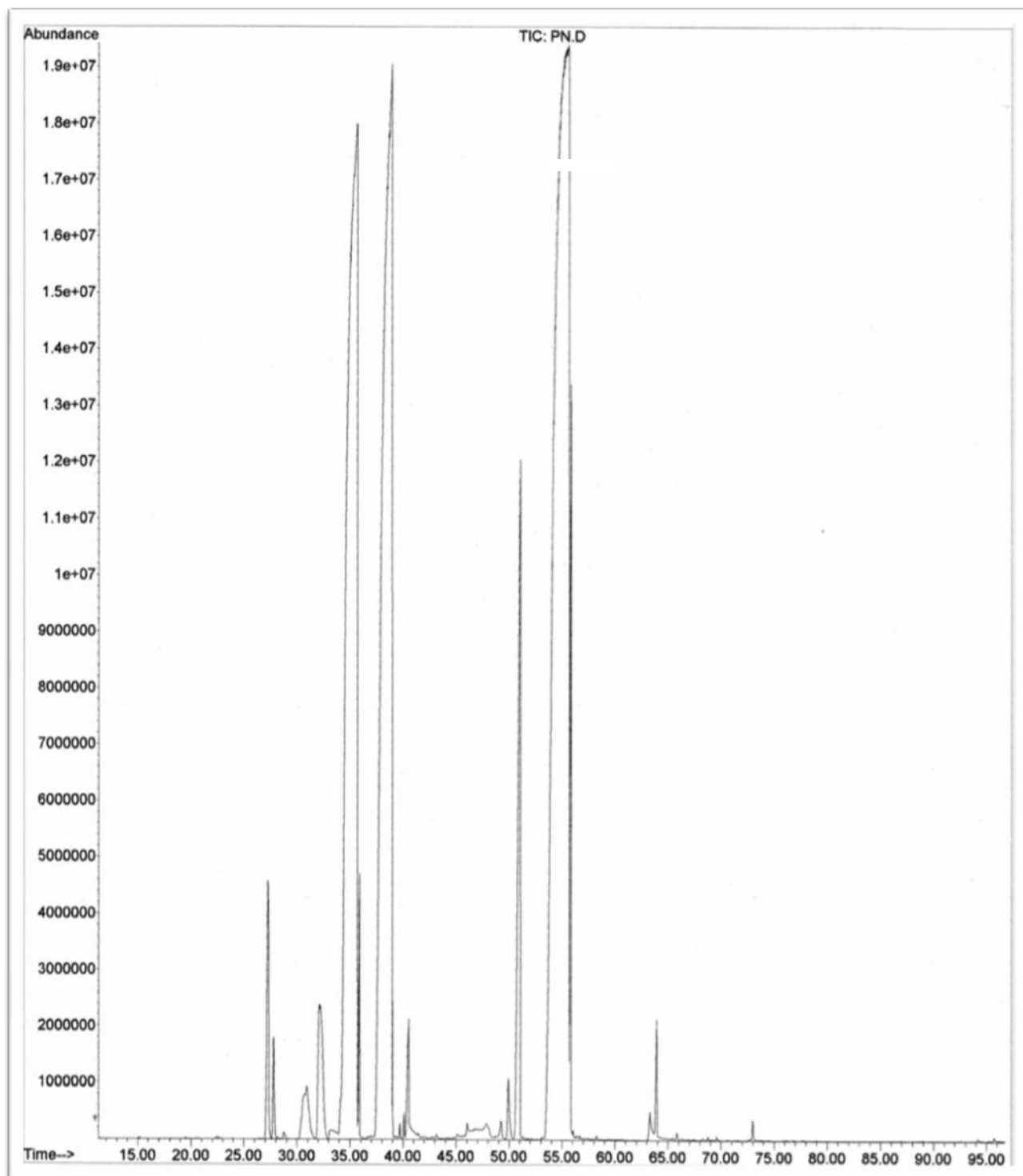


Figure 3.26 : Chromatogramme CG/SM de l'HE d'*Origanum floribundum* de Hammam Melouane.

Tableau 3.4 : Composition chimique de l'HE(%) d'*Origanum floribundum*.

N°	Composés	Indice de Rétention (IR)	% du composant	Identification
1	Methyl isovalérate	809	t	SM
2	2-Hexenal	877	t	SM
3	3-Hexen-1-ol	900	t	SM
4	3-Heptanone	920	t	SM
5	Tricyclene	922	t	IR-SM
6	$\alpha$ -Thujene	924	1.2	IR-SM
7	$\alpha$ -Pinene	930	0.3	IR-SM
8	2,4(10)Thujadien	935	t	SM
9	Camphene	938	t	IR-SM
10	1-Octen-3-ol	961	0.8	IR-SM
11	3-Octanone	962	t	IR-SM
12	$\beta$ -Myrcene	975	1.5	IR-SM
13	$\alpha$ -Phellandrene	995	1.2	IR-SM
14	$\alpha$ -Terpinène	1002	0.1	IR-SM
15	p-Cymène	1003	<b>24.4</b>	IR-SM
16	$\beta$ -Phellandrene	1005	t	IR-SM
17	Limonene	1009	0.5	IR-SM
18	cis- $\beta$ -Ocimene	1017	t	IR-SM
19	trans- $\beta$ -Ocimene	1027	t	IR-SM
20	$\gamma$ -Terpinene	1035	<b>24.4</b>	IR-SM
21	cis-Sabinene hydrate	1037	0.1	IR-SM
22	p-Cymenene	1050	t	IR-SM
23	$\alpha$ -Terpinolene	1064	t	IR-SM
24	Linalool	1074	0.6	IR-SM
25	trans-Sabinene hydrate	1076	t	IR-SM
26	Borneol	1134	t	IR-SM
27	4-Terpineol	1148	0.1	IR-SM
28	$\alpha$ -Terpineol	1159	0.1	IR-SM
29	Thymol methyl ether	1208	0.3	IR-SM
30	Carvacrol methyl ether	1224	<b>3.5</b>	IR-SM
31	Cuminaldehyde	1226	t	IR-SM
32	Thymol	1275	<b>38.3</b>	IR-SM
33	Carvacrol	1286	1.8	IR-SM
34	Thymyl acetate	1354	t	SM
35	4,7,7-Trimethylbicyclo[3.3.0]octan-2-one	1400	0.2	SM
36	$\beta$ -Caryophyllene	1414	0.4	IR-SM
37	$\alpha$ -Humulene	1447	t	IR-SM
38	$\beta$ -Bisabolene	1500	t	IR-SM
39	$\gamma$ -Cadinene	1501	t	IR-SM
40	$\delta$ -Cadinene	1505	t	IR-SM
41	cis- $\alpha$ -Bisabolene	1534	t	IR-SM
42	Spathulenol	1551	t	IR-SM
43	Caryophyllene oxide	1561	0.1	IR-SM
	Composés identifiés (%)		99.9	
	Hydrocarbures monoterpéniques		53.6	
	Monoterpènes oxygénés		44.8	
	Hydrocarbures sesquiterpéniques		0.4	
	Sesquiterpènes oxygénés		0.1	
	Autres		1.0	

Composés classés dans l'ordre d'élution sur la colonne apolaire DB1 ; t : trace (<0,1%).

**IR** : Indices de rétentions relatifs à la série d'alcane C<sub>8</sub>-C<sub>16</sub> comparés par rapport à ceux de la littérature [43] ; [186-197].

**SM** : composés identifiés par comparaison de leurs spectres de masse par rapport à ceux des banques de spectres (NIST 2002 et Wiley 7N) [23].

L'analyse par CG/SM de l'HE d'*Origanum floribundum* provenant de Hammam Melouane nous a permis d'identifier 43 composés représentant 99,9% de la composition totale (Figure 3.27).

Les résultats obtenus montrent que le composé principal est un monoterpène oxygéné (Thymol) avec une teneur de 38,3%, suivi du p-cymène et du  $\gamma$  - Terpinène qui ont la même teneur de 24,4%, puis du Carvacrol méthyl éther (3,5%), du Carvacrol (1,8%) et du  $\beta$ -Myrcène (1,5%) (Figures 3.28 et 2.29).

Pourcentage

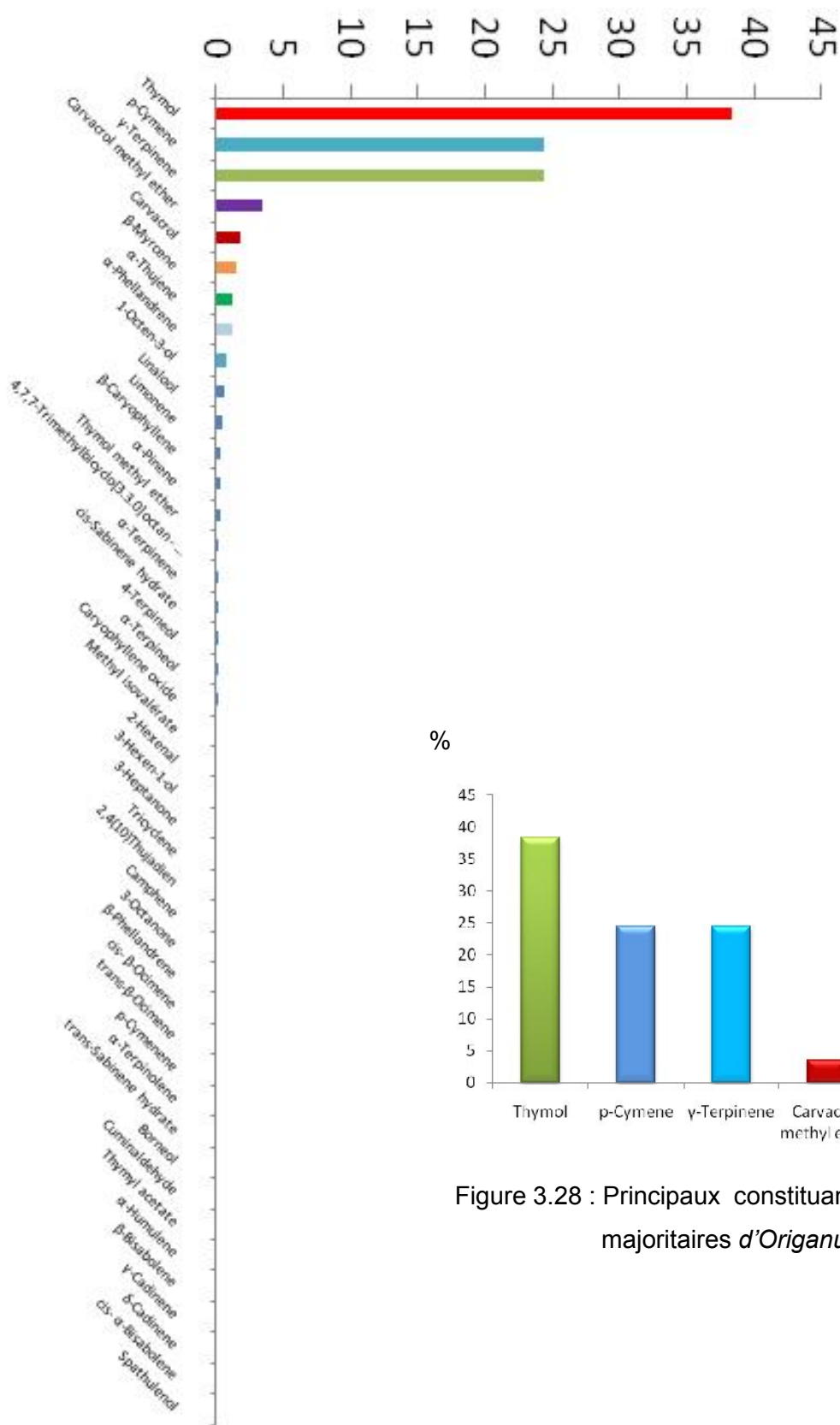


Figure 3.27 : Différents constituants d'*Origanum floribundum*

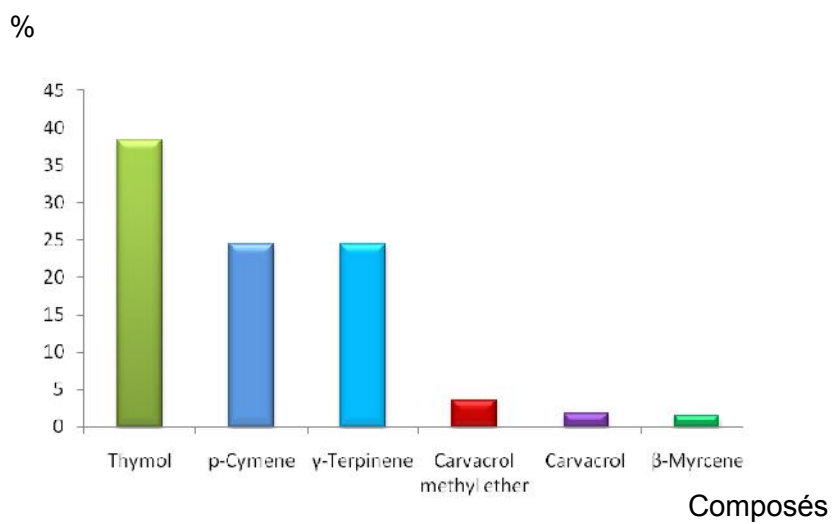


Figure 3.28 : Principaux constituants majoritaires d'*Origanum floribundum*

Composés

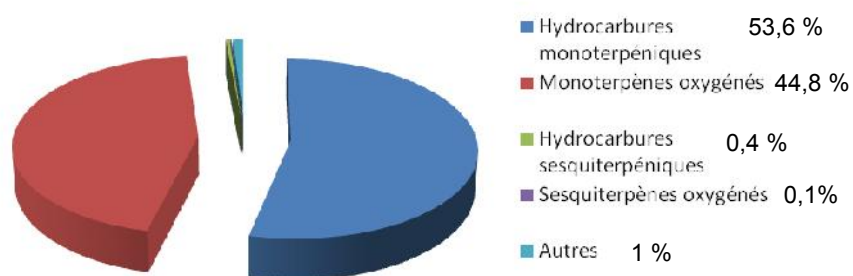


Figure 3.29 : Secteurs de différentes classes chimiques d'*Origanum floribundum*

Nous avons comparé HE étudiée avec celles provenant de Chréa, Kadiria, Setif et de Tunisie (tableau 3.5).

Tableau 3.5 : Comparaison entre les teneurs (%) des composés majoritaires des HE d'*Origanum floribundum* et *glandulosum* d'Algérie selon les régions et de Tunisie.

Composé	Oé	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10
Thymol	<b>38,3</b>	8,4	<b>33,6</b>	<b>27,3</b>	1,1	9,9	13,2	<b>35,0</b>	<b>28,70</b>	7,7	18-39
p-Cymene	24,4	18,5	15,5	<b>24,9</b>	12,4	<b>31,5</b>	17,1	15,1	14,76	3,6	<b>36-46</b>
$\gamma$ -Terpinene	24,4	13,7	19,9	<b>22,3</b>	12,2	7,7	16	27,5	16,65	13,2	12-24
Carvacrol methyl ether	3,5	6,9	0,2	3,6	–	–	–	–	–	–	trace
Carvacrol	1,8	<b>29,6</b>	8,5	1,6	<b>40,0</b>	<b>35,0</b>	<b>33</b>	6,4	<b>22,87</b>	<b>63,7</b>	2-15
$\beta$ -Myrcene	1,5	2,9	3,6	4,8	1,5	--	0,4	1,7	0,40	1,4	trace-0,9

Oé : *Origanum floribundum* de Hammam Melouane (Echantillon testé).

O1 : *Origanum floribundum* de Chréa (Blida) (Hazzit, 2008) [23].

O2 : *Origanum floribundum* de Kadiria (Hazzit, 2008) [23].

O3 : *Origanum floribundum* de Hammam Melouane (Hazzit, 2008) [23].

O4 : *Origanum floribundum* de Chréa (Baser, 2000) [181].

O5 : *Origanum floribundum* de Chréa ( Houmani, 2002) [182].

O6 : *Origanum floribundum* de Tizi-ouzou (Harfi et Aggoune, 2006) [198].

O<sub>7</sub>: *Origanum glandulosum* de Larbaâ (Bousbia, 2004) [60].

O<sub>8</sub>: *Origanum glandulosum* de Bejaia (Chikhouné, 2004) [170].

O<sub>9</sub>: *Origanum glandulosum* de Sétif (Ruberto et al., 2002) [199].

O<sub>10</sub>: *Origanum glandulosum* de Tunisie (Mechergui et al., 2010) [190].

L'HE d'*Origanum floribundum* que nous avons étudié est un chémotype à thymol. Ce dernier composé forme avec le p-cymène et le  $\gamma$ -terpinène la quasi-totalité de l'HE (87,1%). Le carvacrol, composé majoritaire de l'huile essentielle des échantillons de Chréa (O<sub>1</sub>, O<sub>4</sub> et O<sub>5</sub>) ainsi qu'*Origanum glandulosum* de Sétif (O<sub>9</sub>), a été détecté en faibles proportions (1,8%).

Les deux composés généralement majoritaires des huiles essentielles du genre *Origanum* (thymol et carvacrol) peuvent parfois être rencontrés dans des proportions plus ou moins similaires (cas de l'échantillon O<sub>8</sub>). Il a été récemment rapporté que le p-cymène était le composé le plus important de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* de Tunisie (O<sub>10</sub> : 36-46%) [188].

Des similarités et des différences pouvant être très importantes au niveau de la même espèce et au sein des autres espèces du même genre. Cependant, dans tous les cas le thymol, le carvacrol et leurs précurseurs biogénétiques (p-Cymène et  $\gamma$ -Terpinène forment la majeure partie des HE d'Origan avec une teneur de plus de 70%.

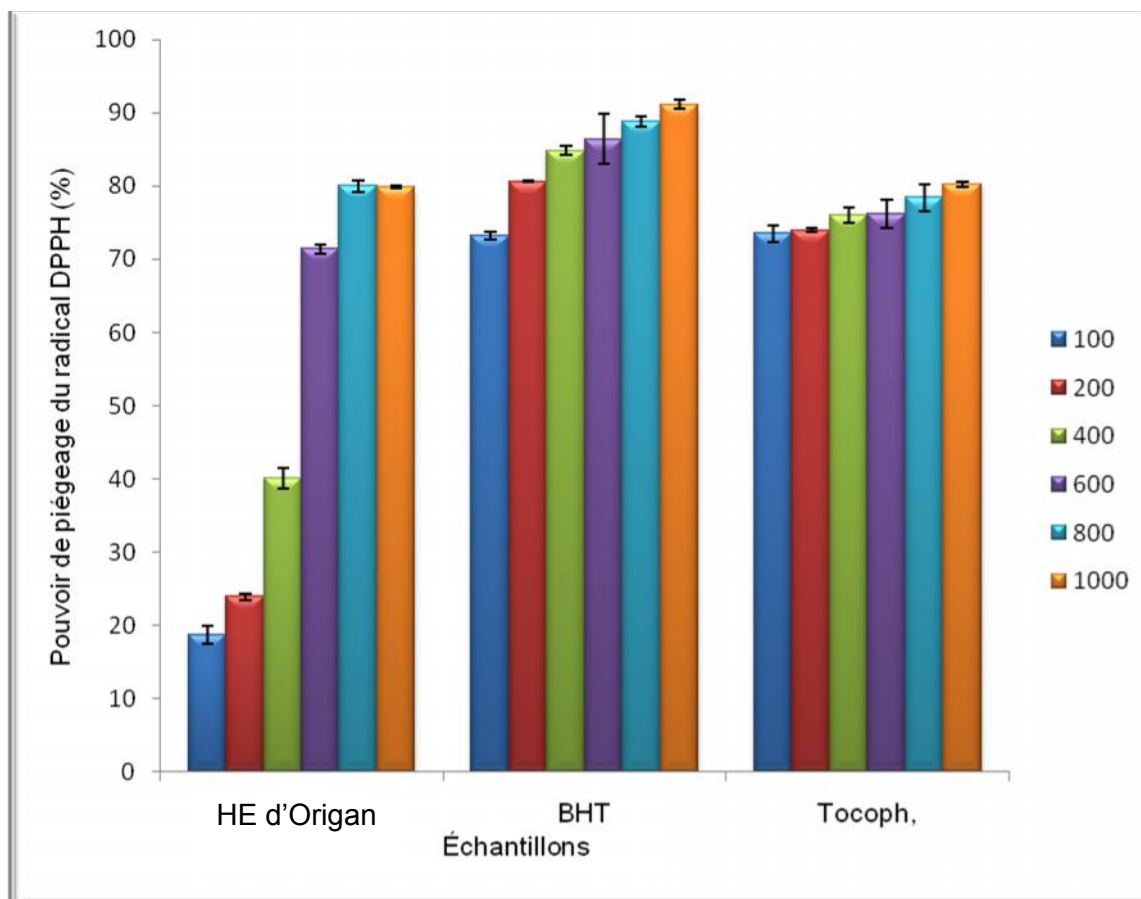
### 3.4. Evaluation de l'activité antioxydante d'HE d'Origan

Nous avons évalué l'activité antioxydante in vitro par deux méthodes différentes : le test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et la mesure du pouvoir réducteur. A des fins comparatives, nous avons pris comme références deux antioxydants de synthèses : BHT (Butyl Hydroxy Toluène) et le tocophérol.

#### 3.4.1. Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité antioxydante des HE d'*Origanum floribundum* a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction du radical DPPH, qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517nm.

Les résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH par les HE d'*Origanum floribundum* ainsi que ceux du BHT et du tocophérol sont rapportés dans l'Appendice F.1 et la Figure 3.30.



HE : Huile essentielle, BHT : Butyl hydroxy Toluène et Tocoph : Tocophérol.

Figure 3.30 : Représentation graphique du pouvoir d'inhibition du radical DPPH par les échantillons d'HE d'*Origanum floribundum*, et des standards (BHT et tocophérol).

Le pouvoir de piégeage du radical stable DPPH de l'HE d'*Origanum floribundum* existe puisqu'il est capable de réduire la forme stable du radical vers le Diphenylpicrylhydrazine (coloration jaune).

L'activité antioxydante de l'HE étudiée, du BHT et du Tocophérol augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration. Elle débute de 19%

pour la concentration de 100 pour l'HE d'Origan et atteint le seuil de 80% à la concentration 1000. Il apparait clairement que l'HE d'Origan présente une capacité de réduction du radical DPPH comparable à celles du tocophérol et BHT à partir des concentrations 600 mg/L (Figure 3.30) et (Appendice F.1).

La forte activité de l'HE peut être due à sa forte teneur en thymol, ce dernier est un composé phénolique capable de piéger les radicaux libres grâce aux groupements hydroxyles dans sa structure chimique.

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,  $\gamma$  terpinène [200], p-cymène [98], carvacrol méthyl ether et thymol méthyl ether. 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 [201].

L'étude statistique (ANOVA 2) (appendice H.2.1) nous a permis de mettre en évidence l'effet significatif de la nature de l'antioxydant (HE, BHT et Tocopherol) et de la concentration sur le pouvoir de piégeage du radical DPPH.

Le test de Newman-Keuls nous a permis de classer ces variables selon leurs activités de piégeage du DPPH (appendice H.2.1) comme suit :

- Les antioxydants      BHT > Tocophérol > HE
- Les concentrations    1000 > 800 > 600 > 400 > 200 > 100 mg/l

#### 3.4.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur mesure la capacité de réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ), donc la mesure de l'aptitude d'une huile essentielle à interagir avec les molécules chimiques réactives (couleur jaune), en tant que donneur d'électrons tels que les radicaux libres. Ces radicaux ainsi réduits deviennent plus stables (couleur bleu vert).

Le BHT et l'acide ascorbique ont été pris comme antioxydants de références. Les résultats du pouvoir réducteur d'HE étudiée, BHT et acide ascorbique



exprimés par l'absorbance à 700 nm, sont résumés dans l'Appendice F.2 et Figure 3.31.

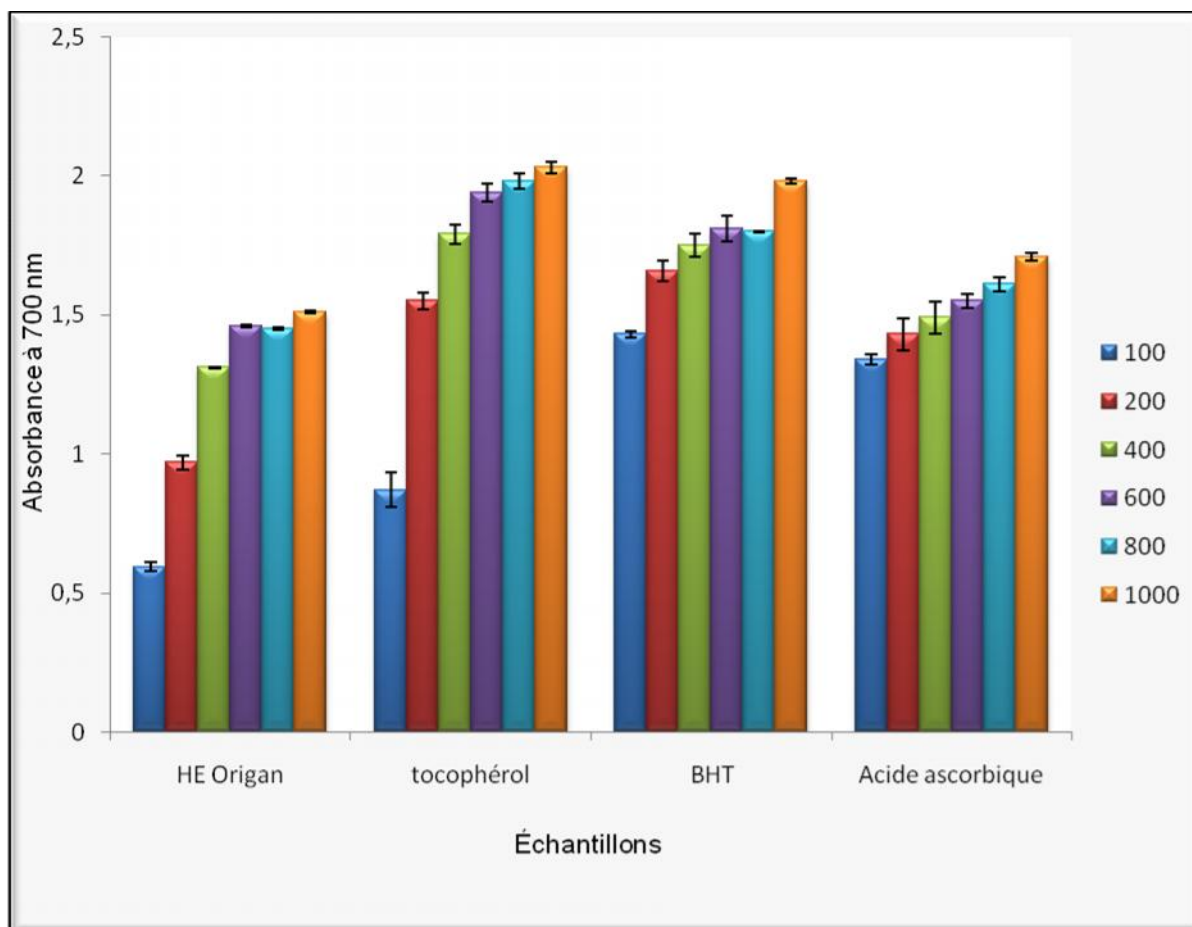


Figure 3.31 : Test du pouvoir réducteur de l'HE *d'Origanum floribundum*, Tocophérol, BHT, Acide ascorbique.

Nous remarquons que l'HE *d'Origanum floribundum* a un bon pouvoir réducteur qui augmente avec la concentration (Figure 3.31). L'HE étudiée est légèrement inférieure en comparaison avec ceux de l'acide ascorbique, du BHT et du tocophérol.

L'analyse statistique (appendice H.2.2) montre que l'interaction des variables étudiées (nature de l'antioxydant et concentration) ont un effet significatif sur le pouvoir réducteur. Le test de Newman Keuls nous a permis de classer ces variables selon leurs pouvoirs réducteurs (appendice H.2.2) comme suit :

- Nature des antioxydants BHT > Tocophérol > VitamineC (acide ascorbique) > HE.

- Les concentrations 1000 > 800 ; 600 > 400 > 200 > 100mg/l.

### 3.5. L'activité antimicrobienne d'HE d'*Origanum floribundum* Munby

Nous avons réalisé une étude qualitative et quantitative de l'activité antimicrobienne comme suit :

#### 3.5.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne

Les résultats obtenus relatifs aux diamètres des zones d'inhibition par l'HE en utilisant le test de l'aromatogramme sont groupés dans l'Appendice F.3 et Figure 3.32.

L'interprétation de nos résultats s'est faite par la comparaison avec ceux de l'échelle de mesure mise en place par Meena et Sethi, (1994) [171] et Ela et *al.*, (1996) [172].

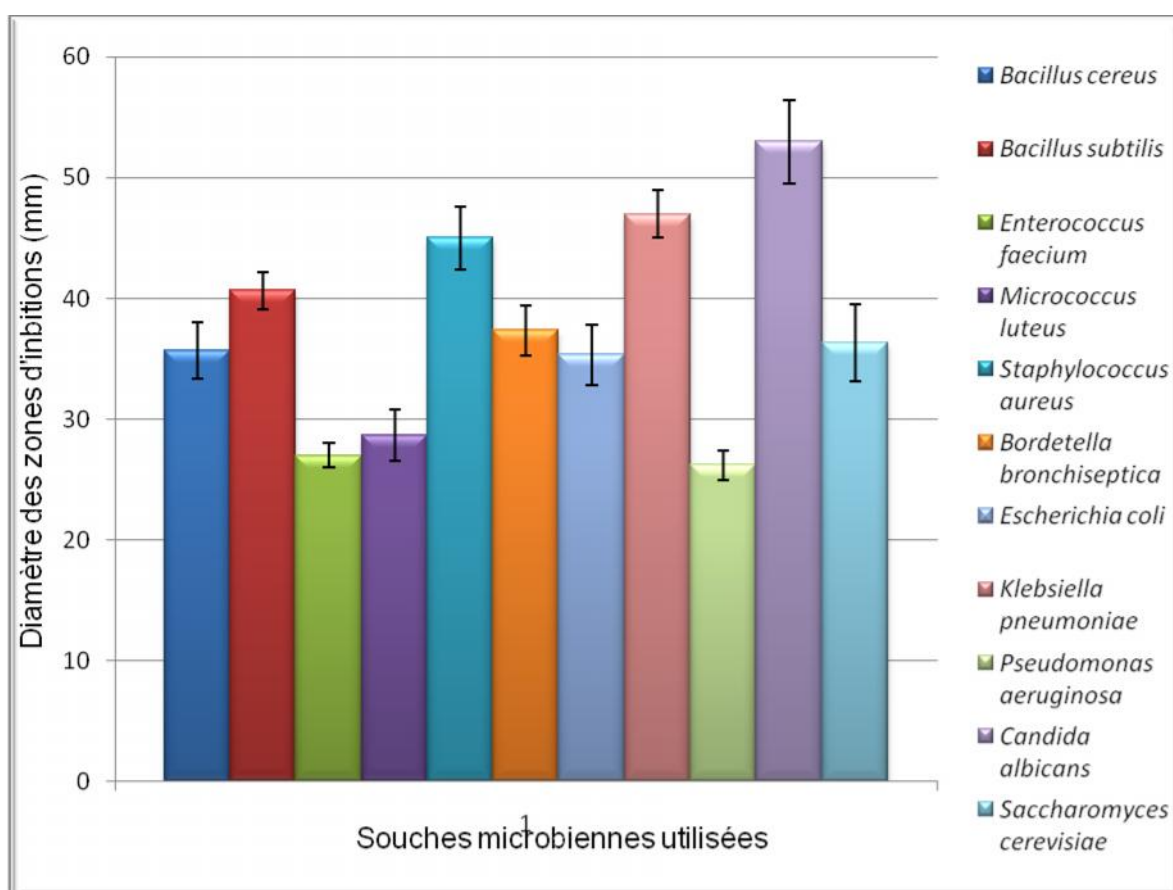


Figure 3.32 : Activité antimicrobienne (étude qualitative) d'HE d'*Origanum floribundum* sur les différentes souches microbiennes.

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 *Staphylococcus aureus* qui a montré une inhibition de croissance la plus élevée (45mm). Cette constatation nous paraît intéressante surtout que cette bactérie est pathogène pour l'homme. Elle est à l'origine de dangereuses intoxications alimentaires.

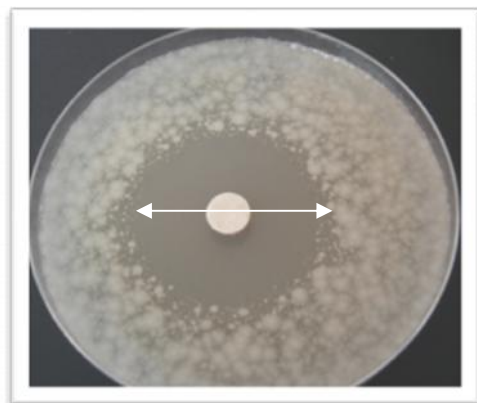
La croissance de *Bacillus subtilis* a été fortement inhibée par l'HE étudiée avec 40,66 mm, suivi de *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* et *Enterococcus faecium* le plus résistant des Gram +, avec respectivement 35,66mm, 28,66mm et 27mm (Figure 3.33).

Dans le cas des bactéries Gram -, nous remarquons que l'HE a inhibé fortement la croissance de *Klebsiella pneumoniae* (47mm). Elle est aussi pathogène pour l'homme. Nous avons obtenu l'inhibition de croissance de *Bordetella bronchiseptica* (37,33mm), *Escherichia coli* (35,33mm), puis *Pseudomonas aeruginosa* qui s'est avérée la plus résistante des bactéries Gram - et + avec une zone d'inhibition plus réduite de 26,17mm (Figure 3.34).

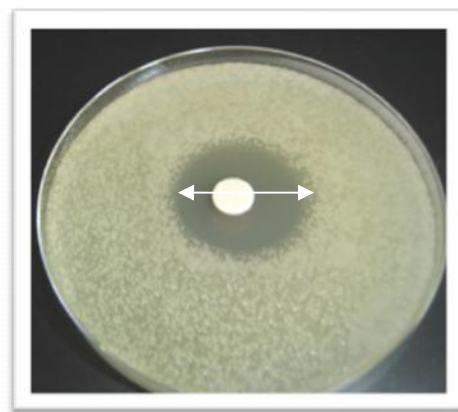
En ce qui concerne les levures, c'est *Candida albicans* qui a montré la plus forte sensibilité vis-à-vis de l'HE avec un halo d'inhibition de 53 mm supérieure à *Saccharomyces cerevisiae* (36,33 mm) et à toutes les bactéries étudiées, ce qui est intéressant du fait que cette levure cause de nombreuses infections chez l'homme (Figure 3.35).

Les résultats de l'analyse statistique (Appendice H.1) en analysant les diamètres des zones d'inhibitions comme variables, ont mis en évidence une différence significative entre les souches microbiennes étudiées (test Newman-Keuls et ANOVA,  $S < 0,05$ ) (Appendice H.1). Ce test a permis de classer les souches selon leur sensibilité comme suit :

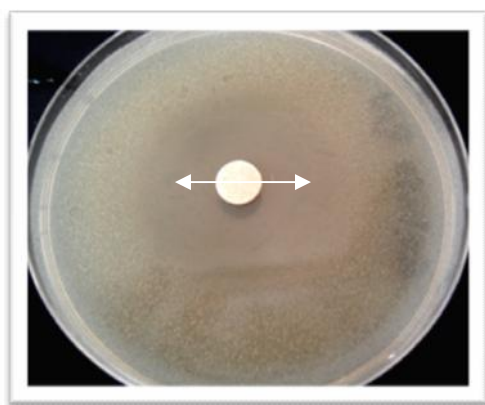
*Candida albicans* > *Klebsiella pneumoneae* ; *Staphylococcus aureus* > *Bacillus subtilis*; *Bordetella bronchiseptica*; *Saccharomyces cereviciae*; *Bacillus cereus* ; *Escherichia coli* > *Micrococcus luteus*; *Enterococcus faecium*; *Pseudomonasn aeruginosa*.



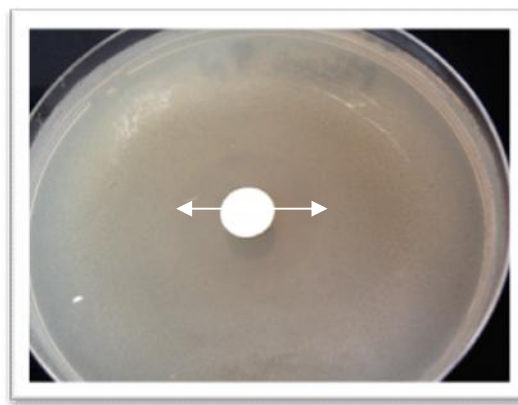
A. *Bacillus subtilis*



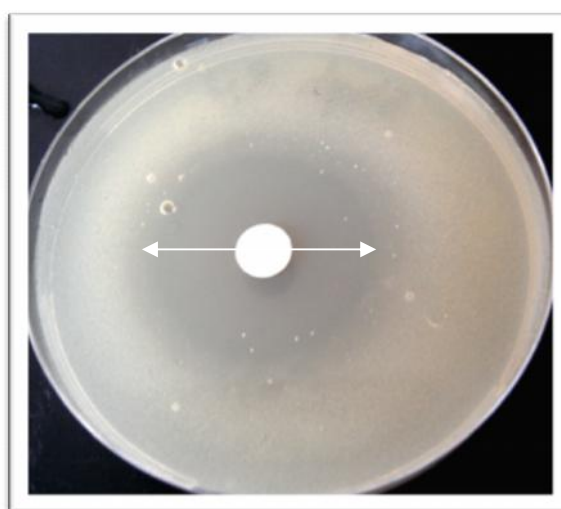
B. *Bacillus cereus*



C. *Enterococcus faecium*



D. *Micrococcus luteus*



E. *Staphylococcus aureus*

↔ : Zone  
d'inhibition

Figure 3.33 : Zones d'inhibition de l'HE d'*Origanum floribundum* testées sur des bactéries Gram positifs (A, B, C, D et E).

(Original, 2010).

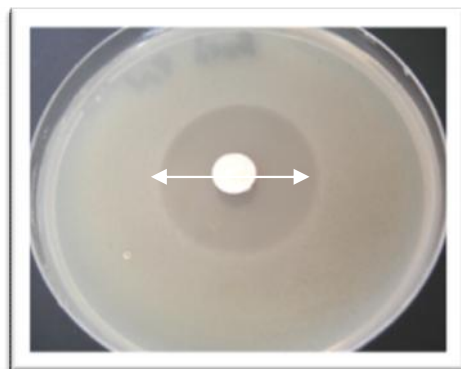
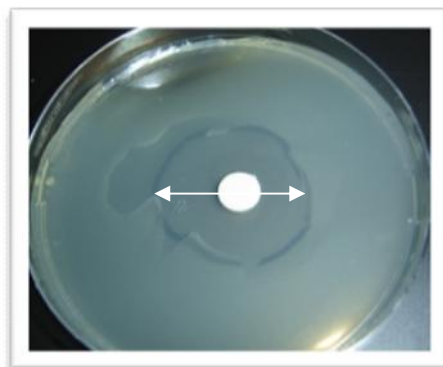
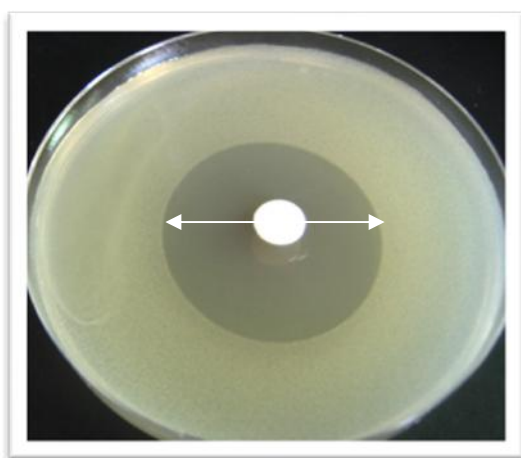
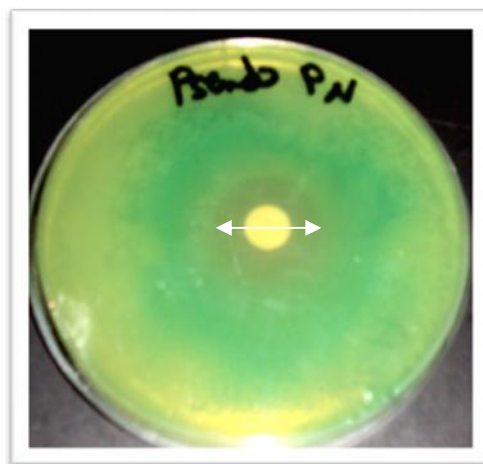
A' *Bordetella bronchiseptica*B' *Escherichia coli*C' *Klebsiella pneumoniae*D' *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 3.34 : Zones d'inhibitions de l'HE d'*Origanum floribundum* testée sur des bactéries Gram négatifs (A', B', C'et D') (Original, 2010).

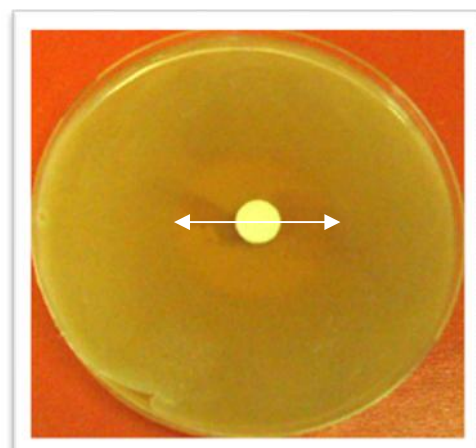
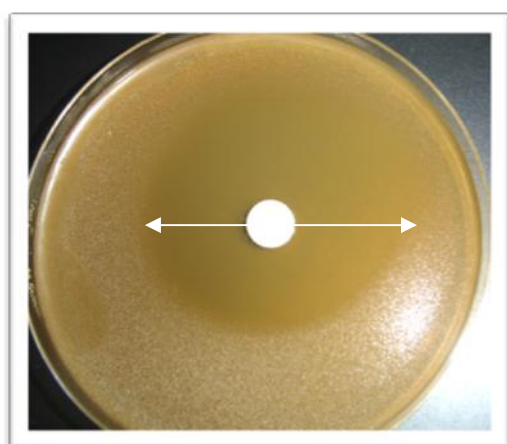


Figure 3.35 : Zones d'inhibitions de l'HE d'*Origanum floribundum* testée sur levures :  
a : *Candida albicans* et b : *Saccharomyces cerevisiae*,

(Original, 2010).

Nous avons comparé notre travail à d'autres travaux de recherche similaires, (même technique, souches ATCC et conditions de travail) (tableau 3.6).

Tableau 3.6 : Comparaison des zones d'inhibition (en mm) de l'échantillon étudié et les travaux de recherche [24 ; 202 ; 203 ; 60 ; 204].

	Oé	Of1	Of2	Of3	Og1	Og2
Bactéries Gram +						
<i>Bacillus subtilis</i>	40,66±1,53	–		55,00±1,00	–	46
<i>Bacillus cereus</i>	35,66±2,30	–	41,67±0,58	–	–	–
<i>Enterococcus faecium</i>	27±1	23,00±1,00	38,67±0,58	–	30,00±1,50	–
<i>Micrococcus luteus</i>	28,66±2,08	–	39,67±1,53	–	–	33
<i>Staphylococcus aureus</i>	45±2,64	42,33±1,53	70,00±1,00	79,00±1,00	32,33±1,53	51
Bactéries Gram –						
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	37,33±2,08	–	44,00±1,00	–	–	42
<i>Escherichia coli</i>	35,33±2,52	23,00±1,00	45,67±1,15	–	28,33±1,04	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	47±2	32,00±1,00	35,00±1,00	50,00±2,00	25,67±1,44	48
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26,17±1,26	33,00±1,00	45,67±1,15	31,00±1,00	12,33±0,29	13
Levures						
<i>Candida albicans</i>	53±3,46	31,33±1,53	+++	52,67±2,52	36,33±2,08	57
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36,33±3,21	–	+++	–	40,67±1,15	56

Oé : *Origanum floribundum* (échantillon testé).

Of<sub>1</sub> : *Origanum floribundum* (Chrèa) [23].

Of<sub>2</sub> : *Origanum floribundum* ( Hammam Melouane) [202].

Of<sub>3</sub> : *Origanum floribundum* ( Kadiria) [203].

Og<sub>1</sub> : *Origanum glandulosum* (Larbâa) [60].

Og<sub>2</sub> : *Origanum glandulosum* ( Chrèa) [204].

– : souche non testée ; +++ : très forte activité inhibitrice.

Le tableau 3.6 montre que les zones d'inhibitions de l'échantillon testé sur *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans*, sont semblables à celles obtenues avec les échantillons d'*Origanum floribundum* de Kadiria et *Origanum glandulosum* de Chrèa. Même observation a été constatée sur *Staphylococcus*

*aureus* et *Enterococcus faecium* de l'échantillon testé comparé avec *Origanum floribundum* de Chréa. Les zones d'inhibition sont similaires entre l'échantillon testé sur *Enterococcus faecium* et *Saccharomyces cerevisiae* et *Origanum glandulosum* de Larbâa.

Nous constatons que toutes les souches microbiennes ont montré un certain degré de sensibilité à l'HE étudiée, d'où l'importance d'utiliser l'HE d'Origan comme l'antibiotique de choix pour le futur surtout qu'il est naturel, à large spectre et ne provoque pas de résistance.

La différence des résultats avec ceux rapportés dans la littérature est due aux problèmes rencontrés tels que :

- Nature du matériel végétal (l'espèce, l'extrait ou l'HE, origine géographique, altitude, saison de cueillette).
- Procédé d'extraction.
- Niveau de pureté du produit final et sa conservation.
- Nature des souches testées.
- Méthodes utilisées pour estimer l'activité antimicrobienne.
- Milieux de culture employés (milieu synthétique ou naturel) [25].

Certains auteurs ont signalé que les bactéries Gram – se sont révélées plus résistants aux HE que les bactéries Gram + [205 ; 206]. D'autres auteurs ont montré que les bactéries Gram – sont généralement les plus sensibles à l'action des HE que les bactéries Gram + [207 ; 145].

La résistance des bactéries Gram – à l'action des HE serait due à la présence d'une seconde membrane qui est composée de lipopolysaccharides (LPS), qui forment une barrière vis-à-vis des HE ayant un caractère hydrophobe [208].

D'autres auteurs ne trouvent pas de différence significative entre la sensibilité des bactéries Gram– et celle des bactéries Gram + [209 ; 210] 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 *Klebsiella*

*pneumoniae* (Gram -) a montré une grande sensibilité par rapport à celle de *Enterococcus faecium* et *Micrococcus luteus* qui sont des bactéries Gram+.

La forte sensibilité de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de l'HE de l'Origan, la plus importante parmi les bactéries a été rapportée par Sari et *al.*, [211] et Chikhouné [170].

*Pseudomonas aeruginosa* citée par plusieurs auteurs, comme étant très résistante à tout agent antimicrobien et antibiotique [22], s'est avérée sensible à l'action d'HE d'*Origanum floribundum*, malgré qu'il s'agisse du plus faible halo d'inhibition (26,17mm).cette valeur est à prendre en considération même si elle est faible par rapport aux autres valeurs obtenues.

La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* est due à sa capacité de former une organisation complexe, composée de différentes strates appelée biofilm. Il est établi que le traitement de telles bactéries nécessite des concentrations élevées d'agents antimicrobiens [22].

Plusieurs chercheurs ont prouvé que ce sont les composés phénoliques qui confèrent aux HE une forte activité antimicrobienne, comme le thymol, le carvacrol, le carvacrol methyl-ether et leurs précurseurs bioénergétiques qui sont y terpinène et p-cymène [43 ; 210].

Il a été montré que le p-cymène est le précurseur du carvacrol n'ont pas d'effet antibactérien quand ils sont utilisés seuls, mais une fois présent avec le carvacrol, il se crée une synergie entre leurs actions. Le p-cymène facilite le transport du carvacrol dans la cellule par augmentation du volume membranaire ce qui résulte sa déstabilisation.

L'action du carvacrol sur *Bacillus cereus* peut être due à sa nature très hydrophobe et à son accumulation au niveau de la membrane plasmique. Il va agir comme échangeur de protons réduisant le pH puis la force motrice de protons (potentiel membranaire) avec diminution de production d'adénosine triphosphate (ATP) ce qui conduit à la mort cellulaire [212].



Le carvacrol agit aussi chez les cellules Gram – par désintégration de la membrane externe libérant les LPS et augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'ATP, ce qui endommage les cellules de manière irréversible [141 ; 210].

L'action du thymol est aussi comparable à celle de son isomère le carvacrol [22 ; 141]. La molécule du thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions du potassium K<sup>+</sup>. En revanche elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa* [213].

Une activité antimicrobienne synergique entre carvacrol et thymol a été signalée par certains chercheurs [214 ; 215 ; 216]

La plupart des travaux qui étudient le mécanisme d'action des composés phénoliques (thymol et carvacrol), avancent que leur principal site d'action est non seulement la paroi cellulaire et membrane détruisant ainsi sa perméabilité et la libération des constituants intracellulaires (ribose, glutamate, Na et les ions). Les composés phénoliques vont aussi altérer la fonction de la membrane comme transport des ions, l'absorption des nutriments, protéines, synthèse des acides nucléiques et activité enzymatique. Cette activité va entraîner la mort cellulaire très courant chez *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* [217 ; 218]

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) [219].

### 3.5.2. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne

Les valeurs des CMI et CMB/CMF de l'HE d'*Origanum floribundum* vis-à-vis des souches microbiennes testées ont été faites en deux répétitions et représentées dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7 : Les CMI et CMB/CMF d'HE d'*Origanum floribundum* contre les différentes souches testées.

Souches	ATCC	Gram	HE d' <i>Origanum floribundum</i>	
			CMI(%)	CMB/CMF(%)
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	0,125	0,5
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	0,125	0,5
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	0,25	0,25
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	0,25	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	0,25	0,5
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	1	1
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	0,5	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	0,125	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	1	1
<i>Candida albicans</i>	24433		0,125	0,25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601		0,06	0,25

L'HE d'*Origanum floribundum* a exercé une activité inhibitrice importante vis-à-vis des bactéries et levures testées. Toutes les souches se sont inhibées à des concentrations entre 0,06% et 1% (v/v), l'activité la plus élevée est *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 3.36) et *Bordetella bronchiseptica* (Figure 3.37). Les plus faibles sont *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 3.39), *Candida albicans* (Figure 3.39), *Klebsiella pneumoniae* (Figure 3.38), *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* (Figure 3.37), ce qui correspond aux zones d'inhibition car les CMI sont inversement proportionnelles aux diamètres des zones d'inhibitions [217].



Figure 3.36 : Détermination de CMI de l'HE vis à vis de *Pseudomonas aeruginosa* sur MH à 1% (a), 0,5%(b) et 0,25% (c) (v/v) (Original, 2010).

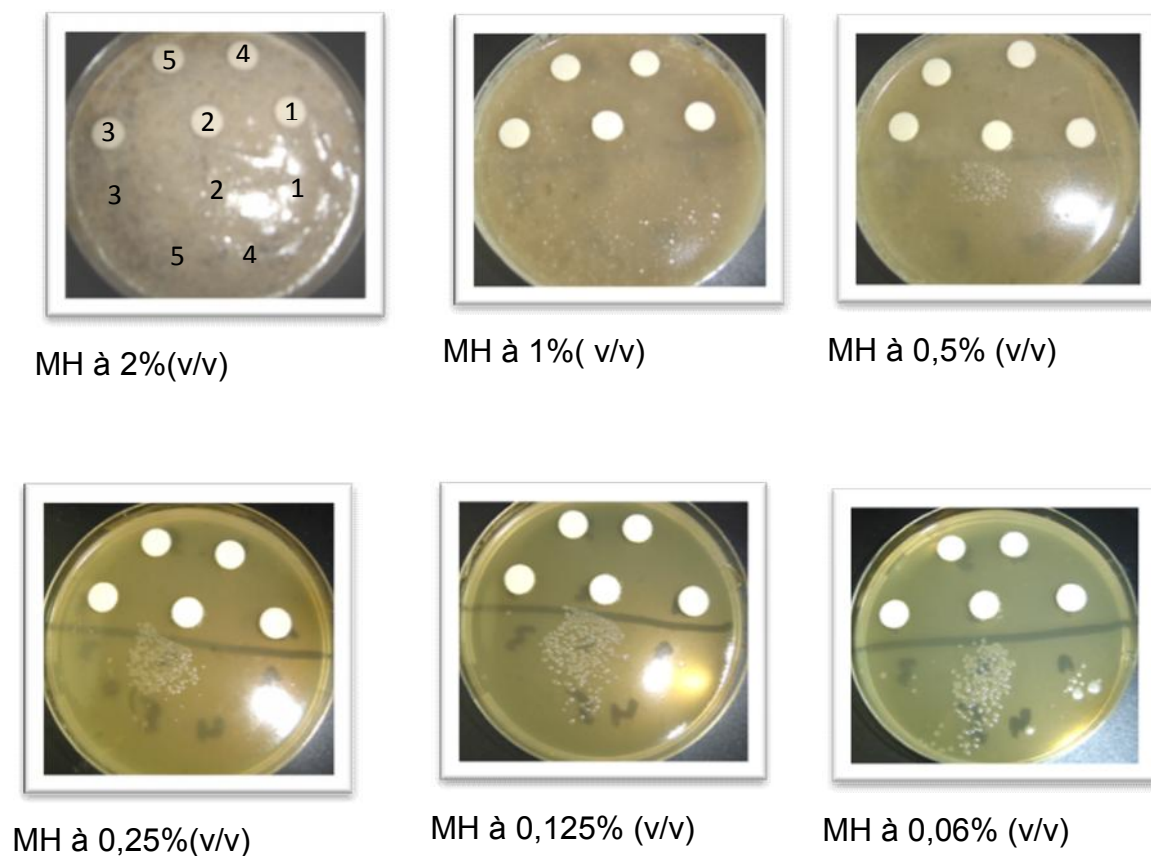


Figure 3.37 : Détermination des CMI de l'HE d'*Origanum floribundum* vis-à-vis des souches bactériennes  
 1 : *Enterococcus faecium*, 2 : *Bordetella bronchiseptica*, 3 : *Bacillus subtilis*, 4 : *Bacillus cereus*, 5 : *Escherichia coli*  
 (Original, 2010).

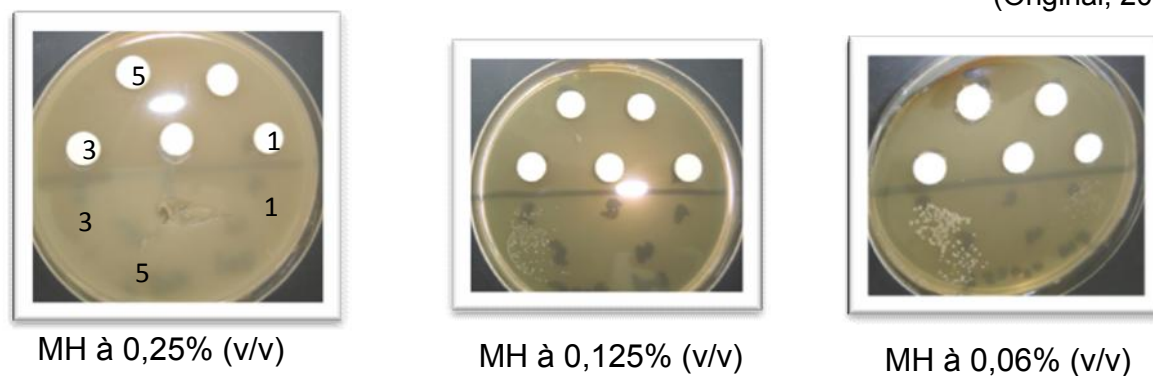


Figure 3.38 : Détermination de CMI de l'HE vis-à-vis des bactéries 1 : *Klebsiella pneumoniae*,  
 2 : /, 3 : *Staphylococcus aureus*, 4 : /, 5 : *Micrococcus luteus* (Original, 2010).



Figure 3.39 : Détermination des CMI de l'HE d'*Origanum floribundum* vis-à-vis des levures *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* (Original, 2010).

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI, ont permis d'observer les concentrations minimales bactéricides (CMB) sur les 9 bactéries et les concentrations minimales fongicides (CMF) sur les deux levures testées.

La concentration minimale bactéricide et/ou fongicide est souvent égale ou plus élevée que la CMI. Sur toutes les bactéries testées, les valeurs de CMB sont superposables chez *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Enterococcus faecium* et *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 3.40). En revanche, il faut au moins le double de la CMI pour obtenir l'effet fongicide sur *Candida albicans* (Figure 3.41) et bactéricide sur *Staphylococcus aureus* (Figure 3.40).

On doit avoir quatre fois la CMI pour obtenir l'effet bactéricide sur *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* et *Klebsiela pneumoniae* (Figure 3.40). L'effet fongicide sur *Saccharomyces cerevisiae* nécessite aussi quatre fois la CMI (Figure 3.41).

Les valeurs les plus élevées des CMB/CMF enregistrées à 1% (v/v) sont enregistrées chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* et *Bordetella bronchiseptica*. Quand aux valeurs les plus faibles, qui sont à 0,25% (v/v) sont obtenues chez *Candida albicans*, *Enterococcus faecium* et *Saccharomyces cerevisiae*.

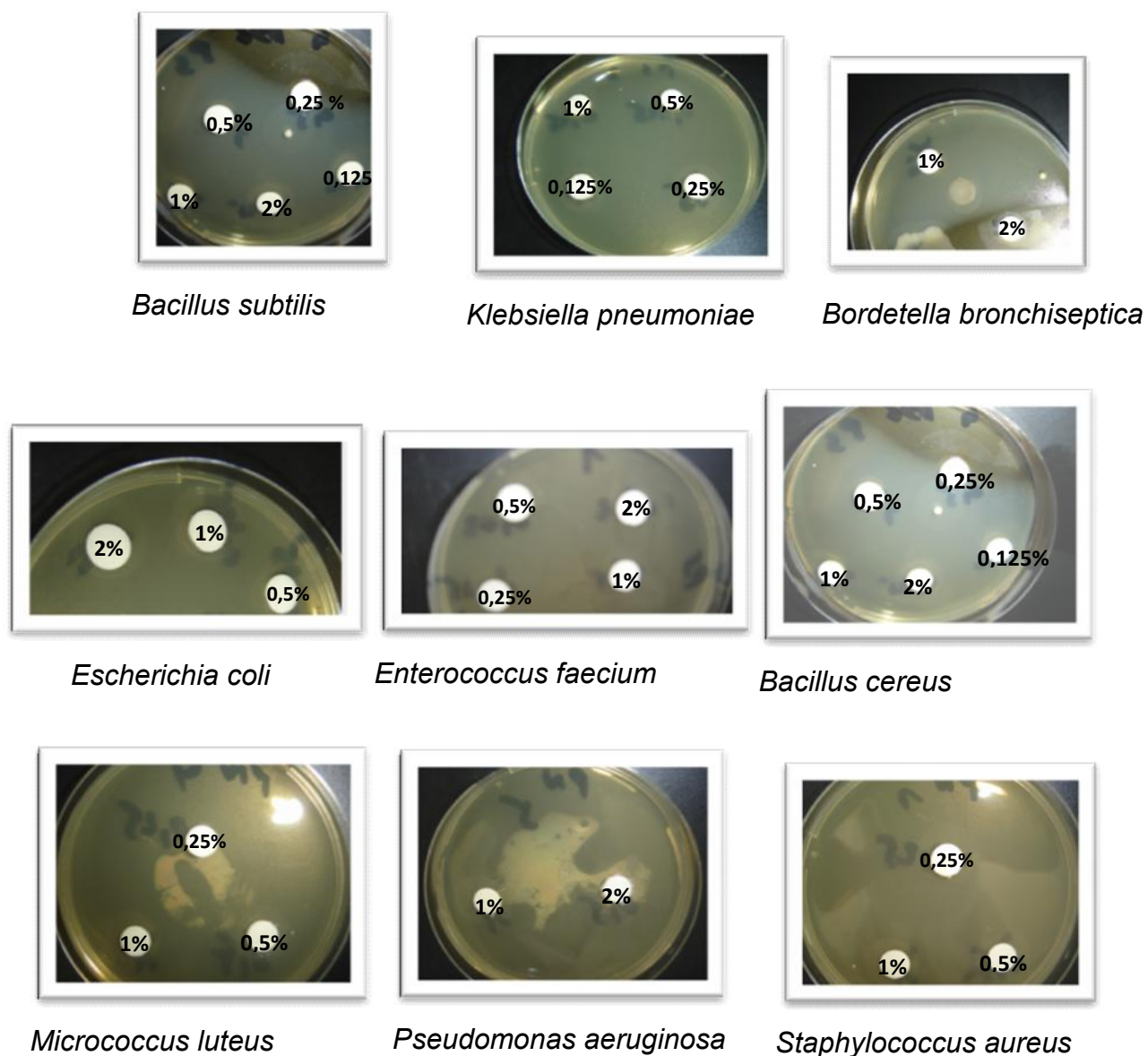


Figure 3.40 : Détermination des CMB de l'HE d'*Origanum floribundum* vis-à-vis les bactéries testées (Original, 2010).

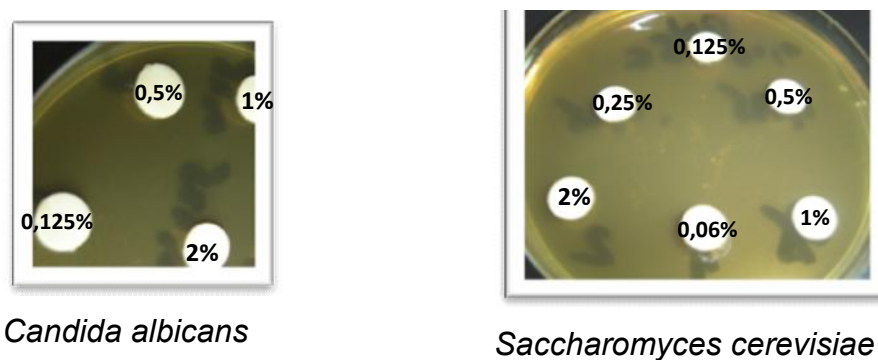


Figure 3.41 : Détermination des CMF de l'HE d'*Origanum floribundum* envers les levures testées (Original, 2010).

Malgré les variations des CMI et CMB et / ou CMF d'un microorganisme à un autre, dans certains cas, elles sont égales indiquant ainsi une forte action bactéricide et fongicide. En effet, lorsque le rapport CMB/CMI (CMF/CMI) est supérieure ou égal à 4, l'HE est dite bactériostatique et / ou fongistatique [220]. Par contre, lorsque le rapport CMB/CMI (CMF/CMI) est inférieure à 4, l'HE est dite bactéricide et ou fongicide. Le tableau 3.8 présente les différents rapports CMB/CMI, CMF/CMI.

Tableau 3.8 : Rapport CMB/CMI, CMF/CMI de d'HE d'*Origanum floribundum* utilisés vis-à-vis des souches bactériennes et des levures.

Souches	CMB/CMI ou CMF/CMI	Interprétation
<i>Bacillus subtilis</i>	4	Bactériostatique
<i>Bacillus cereus</i>	4	Bactériostatique
<i>Enterococcus faecium</i>	1	Bactéricide
<i>Micrococcus luteus</i>	4	Bactériostatique
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	Bactéricide
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	1	Bactéricide
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	Bactériostatique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	Bactéricide
<i>Candida albicans</i>	2	Fongicide
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	Fongicide

Le tableau 3.8 montre que l'HE testée a un pouvoir bactéricide sur cinq bactéries parmi les neuf testées et fongicide sur les deux levures testées. Nous pouvons dire que l'HE d'*Origanum floribundum* a révélé, à la fois une bonne activité bactéricide et fongicide. Cette activité explique et favorise leur application aux produits pharmaceutiques.

L'importante action antimicrobienne démontrée par l'HE d'*Origanum floribundum* est en relation avec sa forte teneur en thymol et en carvacrol. Ces deux composés phénoliques sont connus pour avoir une grande action antimicrobienne et sont considérés comme les composés chimiques purs. Les plus efficaces et les plus larges d'action sont les phénols à forte concentration. Ils

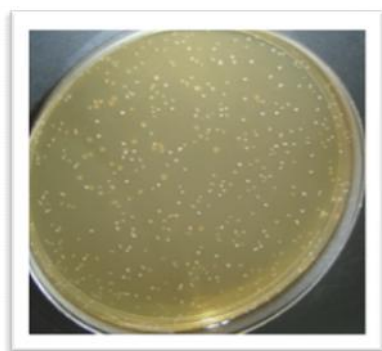
sont responsables d'une action bactéricide rapide car ils traversent la paroi bactérienne et dénaturent les protéines. A faible concentration ils sont bactériostatiques [22]. Les phénols sont suivis par les monoterpènes (pinènes et limonènes) [141].

Les résultats du dénombrement des souches *Candida albicans* et d'*Escherichia coli* respectivement après 48h et 24h d'incubation, nous ont permis de compter les colonies obtenues à l'aide d'un compteur de colonies. La figure 3.42 montre les colonies obtenues des souches testées.

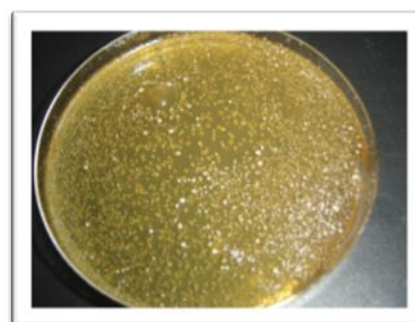
Nous avons pu dénombrer 321 colonies pour *Escherichia coli* et 398 colonies pour *Candida albicans* dans la dilution  $10^{-6}$

Pour *E.coli* :  $X = 321 \times 1/1 \times 1/10^8 = 3,21 \times 10^6 \text{ UFC/ml.}$

Pour *Candida albicans*  $X = 398 \times 1/1 \times 1/10^8 = 3,98 \times 10^6 \text{ UFC/ml.}$



*Escherichia coli*



*Candida albicans*

Figure 3.42 : Dénombrement des colonies obtenues de la souche *Candida albicans* après 48 h d'incubation et *Escherichia coli* après 24h d'incubation (Original, 2010)

Ce qui nous confirme les concentrations de la suspension mère prise au départ, conformes aux normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) [221].

### 3.6. Préparations et contrôle physico-chimique de la pommade dermique

Les pommades dermiques à base d'HE d'*Origanum floribundum* aux concentrations 0,5%, 1% et 2% (figure 3.43) sont préparées en respectant les règles de BPF.

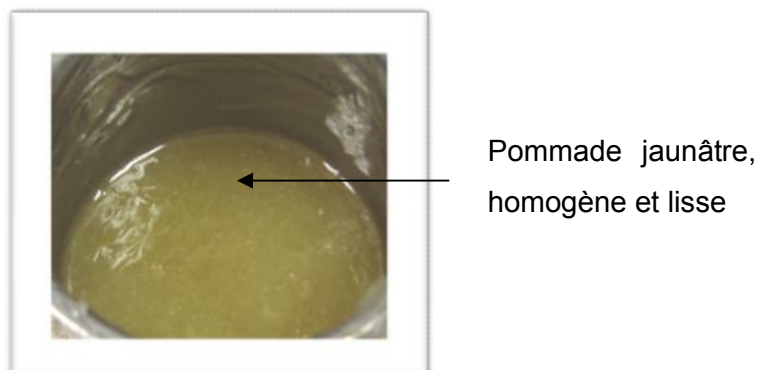


Figure 3.43 : Pommade dermique à base d'HE d'origan  
(Original, 2010).

Les ingrédients utilisés sont répertoriés dans le « Handbook of pharmaceutical Excipients » [174].

L'HE est introduite dans la pommade en usage topique dans le but de mettre en évidence de nouvelles formes thérapeutiques et de valoriser la flore Algérienne riche en principes actifs en dermatopharmacie.

L'association de lanoline à la vaseline est très utilisée dans la composition de formules magistrales et officinales. Le premier composé permet à l'excipient de devenir hydrophile, de lui apporter des propriétés adoucissantes et une meilleure pénétration cutanée [175].

#### 3.6.1. Détermination des caractères organoleptiques

La formulation galénique obtenue est sous forme de pommade de couleur jaunâtre, rigide, lisse et d'aspect brillant. Elle a une odeur très agréable (odeur d'Origan léger). Elle est douce à l'application, ne colle pas et se résorbe par la peau.



### 3.6.2. Contrôle de l'homogénéité

L'observation de la pommade étalée entre lame et lamelle au microscope photonique au grossissement X 100 (figure 3.44), montre qu'aucune présence de grumeaux n'a été observée, donc la pommade est parfaitement homogène.

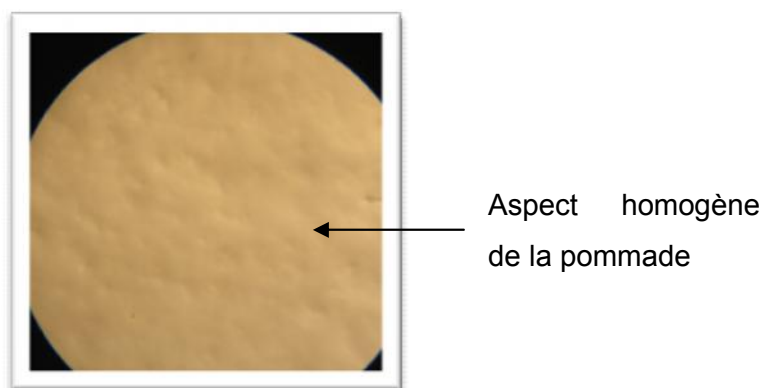


Figure 3.44 : Observation de la pommade dermique au microscope photonique (test d'homogénéité) (Gr X 1) (Original, 2010).

### 3.6.3. Evaluation de la stabilité et vieillissement accéléré

La centrifugation à vitesse constante (4500 tours/min) n'a révélé aucun phénomène d'instabilité. Sa résistance à la centrifugation (critère de stabilité) est apparue très bonne.

### 3.6.4. pH des pommades dermiques

La gamme de pH des préparations s'échelonne entre 6,5 et 8. Il est à noter que le pH de la peau est d'environ 5,5 d'où la nécessité d'avoir un pH neutre ou légèrement acide. Le pH de la pommade que nous avons préparé est de 6.

### 3.6.5. Contrôle de la qualité microbienne des pommades dermiques obtenues

Les résultats du contrôle de la qualité microbienne des pommades dermiques sont mentionnés dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9 : Contrôle microbiologique des pommades dermiques.

Germes recherchés	Notre étude	Normes (Ph Eur)
	UFC/g	UFC/g
Germes mésophiles : levures et moisissures	00	< 100
Germes mésophiles : bactéries	00	< 300
Entérobactéries	00	< 10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	00
<i>Staphylococcus aureus</i>	00	00
<i>Escherichia coli</i>	00	00

Les résultats du contrôle de la qualité microbiologique des pommades étudiées nous a permis de montrer :

- ✓ Absence de germes viables totaux (mésophiles et champignons).
- ✓ Absence d'entérobactéries.
- ✓ Absence d'*Escherichia coli*.
- ✓ Absence de *Staphylococcus aureus*.
- ✓ Absence de *Pseudomona aeruginosa*.

Les résultats montrent un taux de contamination bactérienne et fongique nul et ont permis aussi de montrer l'absence totale de germes pathogènes (Appendice G).

Selon les normes de Pharmacopée Européenne [177], les lots des pommades analysées sont exempts de toutes contaminations microbiennes. Ils sont ainsi déclarés conformes et propres à l'utilisation.

La protection microbiologique des pommades est obtenue en utilisant un conservateur adapté (HE d'Origan) à la formulation.

### 3.7. Essais pharmaco-toxicologiques

Pour étudier l'indice d'irritation primaire cutanée et l'activité cicatrisante nous avons suivi les étapes suivantes :

#### 3.7.1. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée (IPC) de l'HE

La réaction cutanée érythème et œdème est évaluée et quantifiée sur les zones d'essais et de témoins (Figures 3.45 et 3.46).

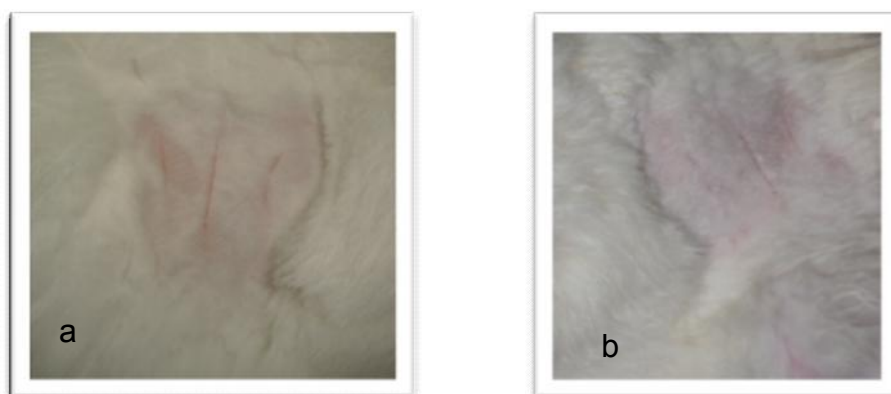


Figure 3.45 : Lapins témoins après scarification et sans traitement

**a** : après 24 heures

**b** : après 72 heures

(Original, 2010).



Figure 3.46 : Lapins testés, après scarification et application de la pommade à base d'HE d'*Origanum floribundum*

**c** : après 24 heures

**d** : après 72 heures

(Original, 2010).

Les résultats de l'évaluation de l'irritation cutanée primaire chez les lapins traités et témoins de l'expérimentation sont présentés dans le tableau 3.10.

Tableau 3.10 : Evaluation de l'indice d'irritation cutanée primaire chez des lapins traités par la pommade d'HE d'*Origanum floribundum* .

N° de lapin	Flanc traité				Flanc témoin			
	Œdème		Erythème		Œdème		Erythème	
	J1(24h)	J3(72h)	J1(24h)	J3(72h)	J1(24h)	J3(72h)	J1(24h)	J3(72h)
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	0	0	1	0
3	0	0	1	0	0	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0	1	0
5	0	0	1	0	0	0	0	0
6	0	0	1	0	0	0	1	0

Les résultats obtenus qui figurent dans le tableau 3.10 montrent uniquement de légers érythèmes au cours de la première observation (24h), qui s'estompent après 72h. Notons qu'il y'a une absence totale d'œdèmes durant l'expérimentation.

Tableau 3.11 : Evaluation des réactions cutanées.

N° de lapin	Œdème + érythèmes 24h + 72h Flanc traité	Oedème +érythèmes 24h + 72h Flanc témoin
1	0	0
2	1	1
3	1	0
4	1	1
5	1	0
6	1	1
Valeurs cumulées	5	3

Pour classer notre produit, nous avons calculé l'indice d'irritation primaire cutanée (IP) [178], à partir des valeurs (du tableau 3.11) et de l'équation suivante :

$$IP = (\text{Œdème} + \text{Erythème})_{\text{Flanc traité}} + (\text{Œdème} + \text{Erythème})_{\text{Flanc témoin}} / 24$$

24 = nombre de lapins (6) x nombre de zones testées (traité et témoin = 2) x nombre de type d'irritation (œdème et érythème = 2).

$$\text{Nous déduisons : } IP = \frac{5 + 3}{24} = 0,33$$

Le résultat obtenu montre que l'indice d'irritation primaire (IP) est de 0,33, qui est inférieur à 0,5 ce qui nous amène à déduire que la pommade d'HE d'*Origanum floribundum* est non irritante pour la peau et peut être utilisée dans les traitements topiques.

### 3.7.2. Etude de la cicatrisation de plaies in vivo de la pommade dermique

Les résultats des cotations numériques qui correspondent aux paramètres suivants : œdème, bourgeonnement et épaisseur de la croûte sont mentionnés dans le tableau 3.12.

Tableau 3.12 : Evaluation des paramètres de cicatrisation chez le rat, pour chaque produit appliqué, en fonction du temps (jours).

Produit s	Paramètre s	Aucun trait	Excipient	POM ORI 0,5%	POM ORI 1%	POM ORI 2%	MADECA 1%
0	Œdème	0	0	0	0	0	0
	Bourgeon	0	0	0	0	0	0
	Croûte	0	0	0	0	0	0
2	Œdème	1 – 2	0 – 2	1 – 2	0,5 – 2	0 – 1	1 – 2
	Bourgeon	0 – 1	0 – 1	1	1 – 1,75	1,5 – 3,5	1 – 2,5
	Croûte	1	1	0 – 0,5	0 – 1,5	0 – 1	0 – 1
6	Œdème	0 – 1	0 – 1	0	0	0	0 – 1
	Bourgeon	1 –	1 – 2	1,5 –	1 – 2	2 – 3	1 – 2
	Croûte	2,5	1	2,5	1 – 3*	2 – 3*	1 – 2*
8	Œdème	0 – 1	0 – 1	0	0	0	0
	Bourgeon	2 – 3,5	1 – 2,5	2	1	1	1
	Croûte	1 – 2*	1,5 – 2*	2 *	1*	3 – 1*	3 – 1*
12	Œdème	0	0	0	0	0	0
	Bourgeon	2,5	2	1	0	0	0
	Croûte	3*	2*	0	0	0	0
14	Œdème	0	0	0	0	0	0
	Bourgeon	2,5 –	1 – 2,5	0	0	0	0
	Croûte	3,5	0 – 1*	0	0	0	0

\* Nouvelle croûte ; Aucun trait : aucun traitement ; POM ORI : Pommade à base d'huile essentielle d'Origan ; MADECA : Madécasol®.

### 3.7.2.1. Apparition d'un œdème

Nous avons remarqué qu'un œdème apparaît dès le lendemain de la blessure dans tous les cas étudiés (Figure 3.47). Cet œdème s'estompe pour disparaître au 6<sup>ème</sup> jour pour les plaies traitées par la pommade d'HE d'Origan, 8<sup>ème</sup> jour pour celles traitées par Madécasol® (témoin positif). L'œdème arrive à persister jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour pour les rats traités par l'excipient (placebo) et ceux qui ne sont pas traités (témoin négatif).

Nous avons remarqué que les plaies traitées avec la pommade d'HE d'Origan ou produit de référence Madécasol®, présentent moins d'inflammations par rapport à celles qui sont traitées par l'excipient et celles qui ne sont pas traitées.

### 3.7.2.2. Présence de bourgeonnement

Les résultats (Figure 3.47) montrent que le bourgeonnement commence dès le 1<sup>er</sup> jour, mais qu'il est plus important pour les plaies traitées, notamment avec la pommade testée et Madécasol®. La pommade à 2% d'HE montre un bourgeon de 1,5 à 3,5. Il est de 1-1,75 pour la pommade à 1% d'HE, de 1-2,5 pour Madécasol® et de 1 pour la pommade à 0,5% d'HE).

Ce bourgeonnement disparaît au 12<sup>ème</sup> jour, mais les plaies traitées avec l'excipient et celles qui ne sont pas traitées persistent jusqu'au 16<sup>ème</sup> jour.

La présence d'un bourgeon plus précoce, plus charnu se manifeste avec la pommade testée et ce quelque soit la concentration utilisée et le produit de référence Madécasol®, signe d'une meilleure cicatrisation.

### 3.7.2.3. Epaisseur de la croûte et son renouvellement

La croûte se forme dès le 2<sup>ème</sup> jour, plus fine pour les non traités et s'épaissit avec les plaies traitées jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour de façon plus importante avec la pommade à l'HE d'Origan et Madécasol® (2-3 pour la pommade à 2% d'HE).



Figure 3.47 : Evolution du processus de cicatrisation des plaies profondes circulaires (Original, 2010).

Il y'a renouvellement de la croûte au 6<sup>ème</sup> jour chez les plaies traitées par les pommades à 2%, 1% (d'HE) et Madécasol®. Ce n'est qu'au 8<sup>ème</sup> jour que les plaies traitées par la pommade à 0,5% d'HE et les plaies non traitées renouvellent la croûte.

La cicatrisation arrive à son seuil au 12<sup>ème</sup> jour au niveau des plaies traitées avec la pommade 1, 2% d'HE et Madécasol®. C'est au 14<sup>ème</sup> jour que les plaies traitées par la pommade 0,5% d'HE arrivent au seuil de la cicatrisation. Au 18<sup>ème</sup> jour les plaies non traitées arrivent à se cicatrisées.

Nous avons remarqué que la cicatrice du 14<sup>ème</sup> jour, au niveau des plaies traitées par la pommade testée et Madécasol® est fine, superficielle et peu visible.

Les plaies non traitées présentent un pourtour distinct, visible et couvert d'une croûte qui n'est pas encore détachée (Figure 3.47).

#### 3.7.2.4. Surface de la plaie

Nous constatons que la réduction des surfaces des plaies traitées et non traitées augmentent avec le temps. Au 14<sup>ème</sup> jour nous remarquons que cette réduction est plus importante au niveau des plaies traitées par la pommade d'HE à 2% avec une surface de 0,15 mm<sup>2</sup> (plaie presque fermée). La pommade d'HE à 1% a une surface de 0,43 mm<sup>2</sup>, celle de Madécasol® a une surface de 1,17 mm<sup>2</sup>. L'HE à 0,5% possède une surface de 1,45, ensuite celle de l'excipient 1,90 mm puis celle non traitée de 3,27 mm<sup>2</sup> (Figure 3.48) et (Appendice F4).



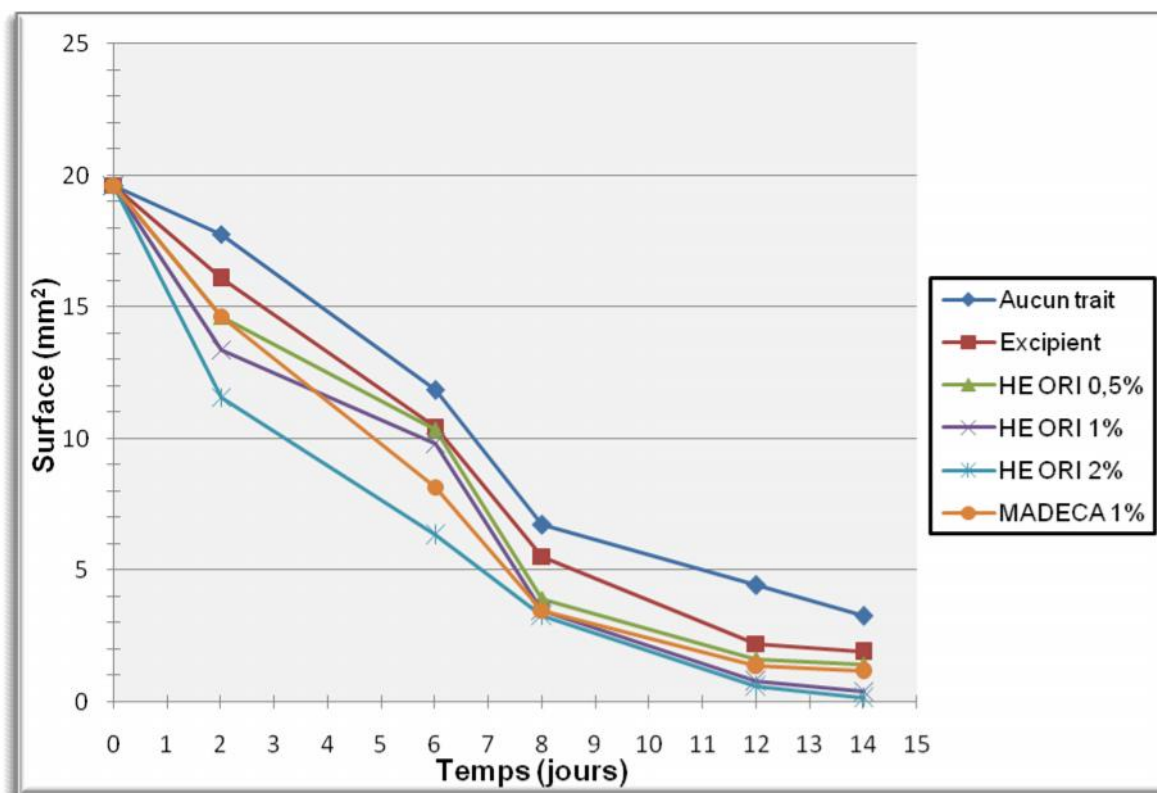


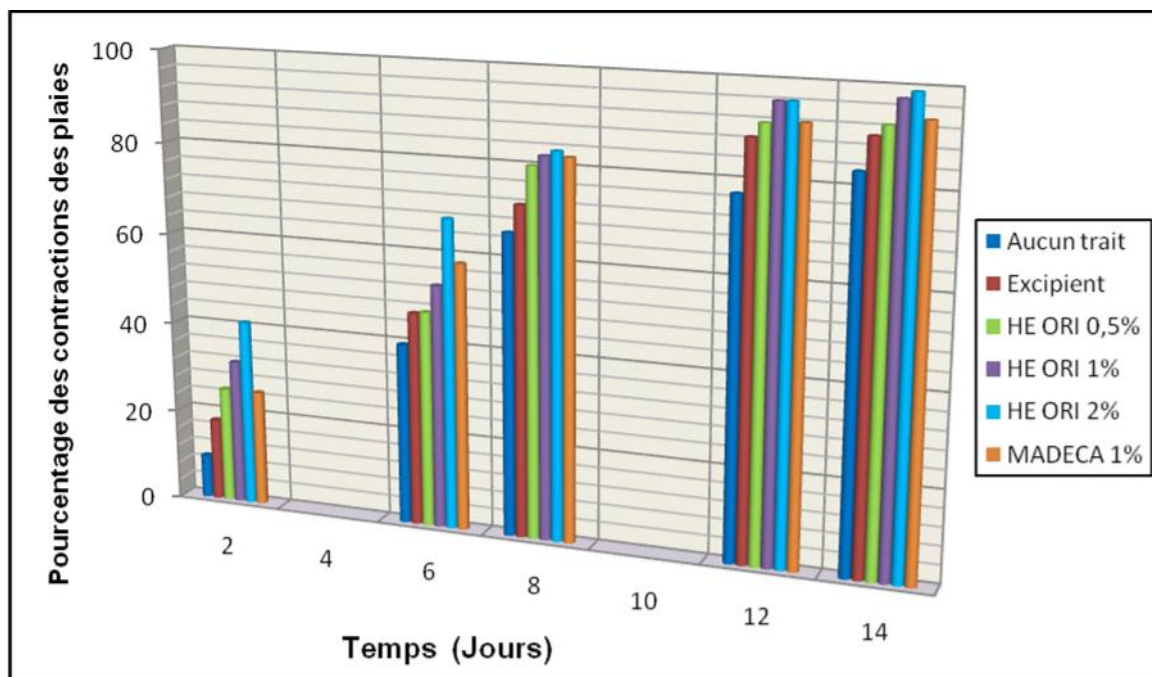
Figure 3.48 : Evolution de la surface de la plaie chez le rat, en fonction du temps.

A partir des surfaces de plaies, le calcul du pourcentage de contraction des plaies s'effectue selon la formule suivante :

$$\% \text{ de contraction} = (S_{j0} - S_{jn}) \times 100 / S_{j0} \text{ [222].}$$

$S_{j0}$  = surface de la plaie au jour 0.

$S_{jn}$  = surface de la plaie au jour 2,6, 8, 12 et 14.



Aucun trait : Aucun traitement ; HE ORI :Pommade à HE d'Origan ; MADECA : Madécasol®.

Figure 3.49 : Pourcentage des contractions des plaies chez le rat en fonction du temps.

La Figure 3.49 et Appendice F5 donnent les pourcentages de réduction des plaies. Nous constatons que le groupe traité par la pommade d'HE d'Origan à 2% présente une réduction de surface assez élevée pour le 14<sup>ème</sup> jour avec un taux de 99,23% par rapport à la pommade à 1%, qui présente un taux 97,80%.

Le produit de référence Madécasol® se classe en troisième position avec un taux de 94%, suivi de la pommade à 0,5% d'HE avec une valeur de 92,60%. L'excipient et le témoin négatif se classent en dernier avec respectivement 90,33 et 83,34%.

L'analyse statistique (appendice H.3.2) montre que l'interaction des variables étudiées (agent cicatrisant et le temps) ont un effet significatif sur la contraction de la plaie, donc sur la cicatrisation. Le test de Newman et Keuls nous a permis de classer ces variables (agents cicatrisants et temps) selon leurs pouvoirs de contraction de plaie (appendice H.3.2) comme suit :

- Agent cicatrisant :

Pommade (P) à 2% d'HE ; P à 1% d'HE ; Madécasol ® 1% ; P à 0,5% d'HE > Excipient > témoin négatif.

- Temps :

14 ours (j) ; 12 j > 8 j > 6 j > 2 j > 0 j.

### 3.7.2.5. Profondeur de la plaie

La figure 3.50 montre qu'avec l'application de la pommade à base d'HE d'Origan pendant 14 jours a nettement réduit la profondeur des plaies. La pommade à 2% a une profondeur de 0,42, suivi de 0,5, 0,6 puis 0,7 profondeurs des pommades respectivement à 1%, 0,5 % d'HE et Madécasol®. Les plaies les plus profondes sont celles de 1 et 2 qui sont attribuées aux respectivement l'excipient et témoin négatif.

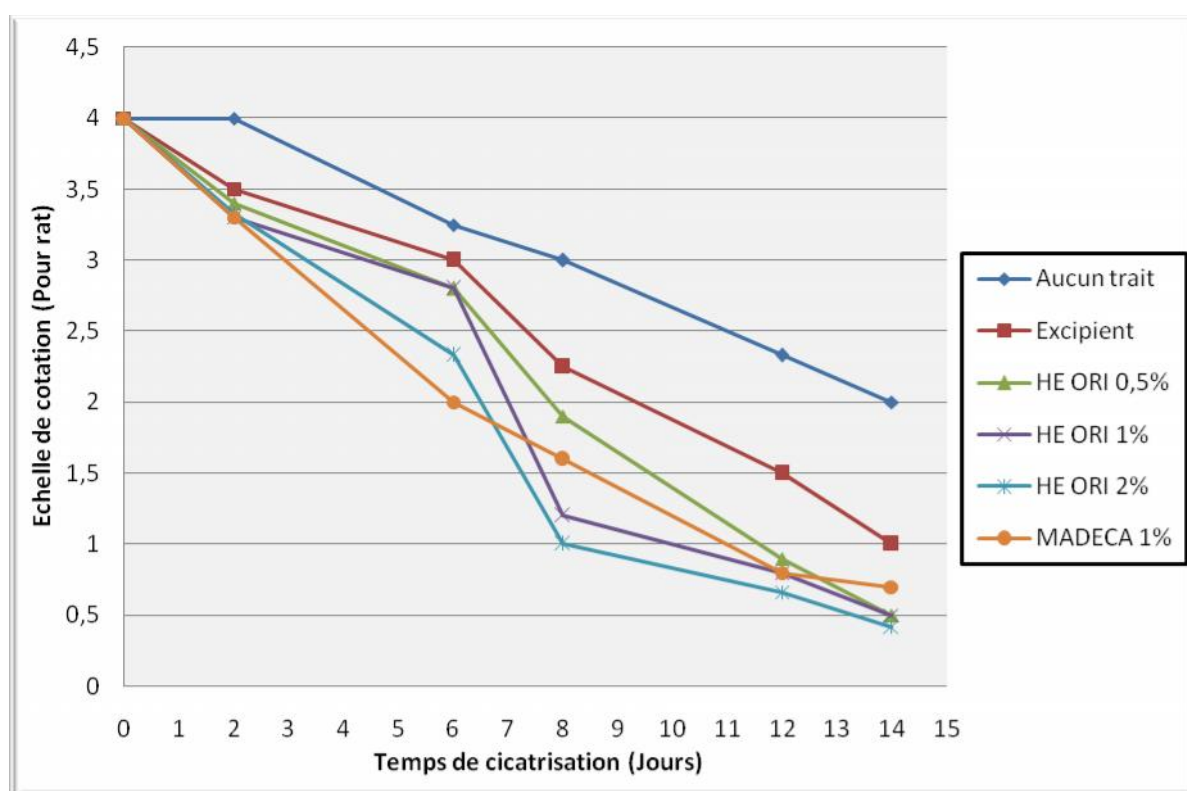


Figure 3.50 : Evaluation de la profondeur de la plaie chez le rat en fonction du temps.

Les résultats obtenus par l'étude de l'activité cicatrisante, indiquent que la pommade à base d'HE d'*Origanum floribundum* a un bon pouvoir cicatrisant. Elle est capable d'accélérer la progression de la fermeture de la plaie et d'améliorer sa guérison à partir de 1% d'HE incorporé dans la formulation de la pommade dermique. A cette concentration et plus la pommade donnait de meilleurs résultats que la pommade de référence qui est Madécasol®.

Nous avons remarqué que l'utilisation de l'excipient seul montre un petit effet cicatrisant par apport au placebo, d'où son importance comme véhicule des principes actifs incorporés dans la pommade.

Les données de notre étude montrent que l'HE d'*Origanum floribundum* possède une activité cicatrisante, activité antimicrobienne à large spectre et la réponse d'irritation cutanée.

Nous pouvons déduire comme il été signalé dans la littérature [66 et 71], l'HE d'Origan est doté de propriétés médicinales pour le traitement d'appoint adoucissant et antiprurigineux des affections dermatologiques, comme trophiques protecteurs dans le traitement des crevasses, écorchures, gerçures et contre les piqûres d'insectes [3]. L'HE d'Origan a la propriété de soulager les douleurs musculaires, rhumatismales, les enflures, les blessures externes, toutes sortes de démangeaisons, désinfection des plaies et traitement des mycoses cutanées.

## CONCLUSION

La flore Algérienne possède de nombreuses plantes aromatiques et médicinales ; celles-ci constituent une source incommensurable pour l'élaboration et la mise au point de nouvelles molécules actives thérapeutiques, quelques unes sont très répandues et abondantes dans certaines espèces d'origan.

Notre intérêt s'est porté sur *Origanum floribundum*, espèce qui pousse spontanément dans les hautes montagnes de Hammam Melouane (Blida- Algérie).

Les observations macroscopiques et microscopiques ont révélé la présence de poils tecteurs et de poils sécréteurs ce sont les trichomes glandulaires. Ils sont présents en surface des épidermes des organes végétatifs et reproducteurs d'*Origanum floribundum*, leurs abondance sur les feuilles et les fleurs est nettement supérieure.

Le rendement en HE obtenu par hydrodistillation à l'échelle semi-pilote est de 1,21%. La cinétique d'extraction des HE d'origan à l'échelle du laboratoire, nous a permis de déduire qu'après 2h d'extraction, la totalité de l'HE emmagasinée au niveau des trichomes glandulaires est récupérée.

Les paramètres physico-chimiques nous ont permis de vérifier que l'HE se conserve bien et peut favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques.

La caractérisation de l'HE par CG/SM, nous a permis d'identifier 43 composés représentant 99,9% de la composition totale de l'HE. Le thymol est le composé majoritaire de l'HE avec une teneur de 38,3%, suivi du p-cymène et du  $\gamma$ - terpinène qui ont une teneur de 24,4%. Le carvacrol méthyl-ether présente 3,5%, le carvacrol 1,8% et du  $\beta$ -myrcène 1,5% de la composition globale.

L'activité antioxydante au DPPH de l'HE, du BHT et tocopherol révèle que l'HE présente une capacité de réduction du radical DPPH comparable à celles du tocophérol et BHT à partir des concentrations 600mg/l.

Cette forte activité antioxydante de l'HE peut être attribuée à la forte teneur en thymol au niveau de l'Origan étudié, composé phénolique capable de piéger les radicaux libres grâce aux groupements hydroxyles dans sa structure chimique.

L'HE d'*Origanum floribundum* présente un bon pouvoir réducteur, qui est proportionnel à la concentration des essais et témoins. Il est légèrement inférieur en comparaison avec ceux de l'acide ascorbique, du BHT et du tocophérol.

L'HE étudiée possède une activité antioxydante considérable, façon de prévenir le stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de rechercher, dans l'alimentation un apport supplémentaire de composés antioxydants comme l'HE d'Origan à coté de la vitamine C et  $\alpha$ -tocophérol. La recherche sur les oxyradicaux et les antioxydants est parfaitement d'actualité car de nombreux mécanismes bioradicalaires restent encore à préciser aussi bien in vitro qu'in vivo.

Les résultats de l'activité antimicrobienne montrent que l'HE possède un large spectre d'action vis-à-vis de tous les microorganismes testés. Il n'y'a pas de différence significative entre la sensibilité des bactéries Gram - et celle de Gram+.

La sensibilité des microorganismes sont classés selon le test de Newman et Keuls comme suit :

*Candida albicans* > *Klebsiella pneumoneae* ; *Staphylococcus aureus* > *Bacillus subtilis*; *Bordetella bronchiseptica*; *Saccharomyces cereviciae*; *Bacillus cereus* ; *Escherichia coli* > *Micrococcus luteus*; *Enterococcus faecium*; *Pseudomonas aeruginosa* .

Les composés phénoliques confèrent aux HE d'origan une forte activité antimicrobienne comme le thymol, carvacrol, carvacrol méthyl-ether et leurs

précurseurs bioénergétiques qui sont p-cymène et  $\gamma$ -terpinène qui créent une synergie entre leurs actions, qui augmenterait l'activité antimicrobienne.

L'évaluation de la CMI et CMB/CMF a révélé que l'HE possède à la fois une forte activité bactéricide et fongicide, ce qui explique et favorise son application dans les produits pharmaceutiques.

L'HE d'Origan est aujourd'hui considéré comme un antibiotique naturel du futur. Cette HE est extrêmement efficace et ne provoque pas de résistance chez les bactéries. L'HE d'Origan ne détruit pas la flore intestinale, mieux elle favorise l'intégrité de l'intestin, garante d'une bonne immunité.

Une pommade à usage topique a été préparée en respectant les règles bonnes pratiques de fabrication des médicaments (BPF). Les caractères organoleptiques montrent qu'elle est de couleur jaune, rigide, lisse, d'aspect brillant, ayant une odeur très agréable. Elle est douce à l'application, parfaitement homogène, stable et possédant un pH de 6.

Le contrôle de la qualité microbienne de la pommade dermique nous a permis de déduire que les lots de pommades analysés sont exempts de toute contamination microbienne et déclarés conformes et propres à la consommation. L'utilisation d'HE comme conservateur et aromatique est adaptée à la formulation.

La pommade d'HE *d'Origanum floribundum* préparée est non irritante pour la peau. Elle présente un IP de  $0,33 < 0,5$  et peut être utilisée pour des traitements topiques. Elle possède aussi un bon pouvoir cicatrisant à partir de 1% d'HE incorporée à la formulation de la pommade dermique. A la concentration de 2% la pommade a un pouvoir cicatrisant nettement supérieur à la pommade de référence utilisée le Madécasol®.

L'inflammation disparaît assez vite avec la pommade de référence et celle de la pommade à base d'HE d'origan. Il est recommandé d'étudier son activité anti-inflammatoire de façon approfondie.

**Perspectives :**

Au niveau économique, cette étude a permis de valoriser cette plante à parfum et de trouver de nouvelles applications dans plusieurs secteurs de pointe comme la dermopharmacie. Elle permet de tester d'autres vertus thérapeutiques de l'HE d'origan comme :

- Activité anti-inflammatoire
- Activité antalgique
- Activité sédatif
- Activité antivirale
- Activité antiparasitaire et insecticide
- Activité diurétique
- Préparation de médicaments à usage interne après de recherches approfondies sur la toxicité aigue d'*Origanum floribundum* en étudiant la dose appropriée.

Il serait intéressant d'analyser les extraits de la plante ainsi que l'hydrolat récupéré lors de l'hydrodistillation de la plante et d'étudier leurs potentiels pharmacologiques. N'ayant pas fait l'objet d'études scientifiques approfondies, les eaux aromatiques constituent un créneau de recherche intéressant.



### Références bibliographiques

1. Telphon, T., « ABC des huiles essentielles », Edition Grancher, Canada, (2005) ,398P.
2. Zhiri, A. et Baudoux, D., « Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies », Edition Inspir Development, Luxembourg, (2005), 80P.
3. Bruneton, J., « Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales », Edition Tec & Doc, Paris, (1999) ,585P .
4. Bourgeois, L., « Le grand livre des plantes aromatiques », Edition Rustica, Paris, (2007), 191P.
5. Bremness, L., « Plantes aromatiques et médicinales », Edition Larousse, Paris, (2005), 304P.
6. Leger, C., « Vitamine E tocophérol et composés apparentés », Edition Poly technica Paris, (1992) ,157P.
7. Atmani, D. et al., « Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants », Food chemistry, 112, (2009), 303-309.
8. Bouhdid, S. et al., « Thymus essential oil: Chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities », Congrès international de Biochimie, Agadir, Maroc, (2006), 09-12.
9. Gérard, G. et May, R., « Le guide de l'aromathérapie », Edition Albin Michel, Paris, (2009) ,382P .
10. Grünwald, J. et Jänicke, C., « Guide de la phytothérapie », Edition Marabout, Munich(2006) ,416P.
11. Anonyme 2006 ., « Aromathérapie.....un peu d'histoire », Nutra News : science, nutrition, prévention et santé octobre(2006) ,6-7.
12. Buronzo, A. Moro., « Grand guide des huiles essentielles », Edition Hachette pratique, France, (2008) ,254P.
13. Kolster, B. C., « Le massage : Le bien être du corps et de l'esprit », Edition Barmby Scan, Paris, (1999),75P .

14. Hampikian, S., « Créez vos cosmétiques Bio », Edition Terre vivante, France, (2009), 192P.
15. Willem, J.P., « Aroma famille », Edition Albin Michel, Paris, (2005), 219P.
16. Paris, M. et Hurabielle, M., « Abrégé de matière médicale pharmacognosie », Tome 1 Généralités monographies, Edition Masson, Paris, (1980), 339P.
17. Anton, R. et Strasbourg, A.L., « Plantes aromatiques :épices aromates,condiments et huiles essentielles », Edition Tec & Doc, Paris (2004), 522P .
18. Anonyme, (AFNOR, Association Française de Normalisation)., « Huiles essentielles, Tome 2 .Monographies relatives aux huiles essentielles », Paris, (2000) ,323P .
19. Anonyme., « Pharmacopée Européenne », 6eme édition, (2008).
20. Catier, Odile. et Roux, Danielle., « Botanique pharmacognosie phytothérapie », Edition Wolters Kluwer, France, (2007), 141P.
21. Paris, R.R. et Moyses, H., « Précis de matière médicale », Tome I, Edition Masson et Cie, Paris, (1965), 416P.
22. Pibiri, Marie.Cécile., « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles », thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse, (2006), 177P.
23. Hazzit, M., « Etude de la composition chimiques des huiles essentielles de différentes espèces de Thym et d'Origan poussant en Algérie », thèse de Doctorat en Chimie, Université des sciences et de la technologie Houari Boumedienne, Alger, (2008) ,204P.
24. Sallé, Jean. Luc., « Les huiles essentielles », Edition Frison-Roche, Paris, (1991), 167P.
25. Guignard, Jean.Louis., « Biochimie végétale », Edition Masson, Paris, (2000), 254P.
26. El Abed, D. et Kambouche, N., « Les huiles essentielles », Edition Dar El Gharb, Oran (2003), 91P.
27. Outaleb, Tydia., « Huiles essentielles et extraits de romarin : composition chimique et activité antioxydante et antimicrobienne », thèse de Magister en Sciences agronomiques option Sciences alimentaires, Ecole Nationale Supérieur d'Agronomie-El Harrach, Alger (2010) ,161P.

28. Willem, Jean.Pierre., « 60 petits maux soignés par les huiles essentielles », Edition Albin Michel, Paris (Novembre 2009), 34P.
29. Werner, Monika., « Les huiles essentielles : Réveil du corps et de l'esprit », Edition Vigot, Paris, (Janvier 2002), 96P.
30. Thompson, J.D., Chalchat, M.A., Linhart, Y.B. and Ehlers, B., « Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes », J chem. Ecol. 29, (2003) 859-880.
31. Mockute, D., Bernotiene, G and Judzentiene, A; « The essential oil of *Origanum vulgare L. ssp vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania) », Phytochemistry, 57, (2001), 65-69.
32. Edris, A.E., Shalaby, A. and Fadel, H., « Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata L*) growing in Siwa oasis Egypt », Europe Food Research Technology, 218, (2003), pp 74-78.
33. Piochon, Marianne., « Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activité pharmacologique et hémisynthèse », thèse de maîtrise en ressources renouvelables, Université de Québec à Chicoutimi (Août 2008), 213P.
34. Willem, J.P., « Les huiles essentielles, médecine d'avenir », Edition Dauphin, Paris(2004), 318 p.
35. Franchomme, P., Pénéol, D. et al., « Clefs pour l'aromathérapie.La molécule aromatique : matière, énergie, information », l'aromathérapie exactement.R.J. Editeur, Limoges .2, (1990), pp73-227.
36. Mailhebiau, P., « La nouvelle aromathérapie : biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs », Edition Jakin, Lausanne(1994), 635P.
37. Smith, C.K., Moore, C.A., Alahi, E.N., Smart, Â.T. and Hotchkiss, S.A., « Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol », Toxicology and Applied Pharmacology. 168, (2000), pp189-199.
38. Naganuma, M., Hirose, S., Nakayama, Y., Nakajima, K. and Someya, T., « A study of the phototoxicity of lemon oil », Archives of Dermatological Research, 278, (1985), pp 31-36.

39. Inouye, S., « Laboratory evaluation of essential oils (Part 1) », International journal of aromatherapy, 13, (2003), pp 95-107.
40. Sivropoulou, A., Papanikolaou, E. et al., « Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils », Journal of food chemistry, 44, (1996), pp 1202-1205.
41. Grosjean, Nelly., « L'aromathérapie tout simplement », Edition Eyrolles, Paris(2007) ,361P.
42. Lucchesi, Marie.Elizabeth., « Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles », thèse de doctorat en sciences, Université de la Reunion Faculté des Sciences et Technologies,(2005),143P.
43. Bendahou, M., Muselli, A., Grignon.Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, j.M., Bernardini, J.F. and Costa, j., « Antimicrobial activity and chemicalcomposition of *origanum glandulosum* Desf . Essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation », Food chemistry, (2007), 106, pp 132-139.
44. Lardy, J.M. et Haberkorn, V., « Les huiles essentielles: principes d'utilisation », Kinésithérapie, la Revue, (Janvier 2007), V 7, Issu 61 pp 18-23.
45. Bachelot, C., Blaise, A., Corbel, T. et Le Guernic, A., « Les huiles essentielles », Licence 2 Biologie, France, (2006), Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord, 26P.
46. Mouhssen,Lahlou., « Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils », Phytotherapy Research,(2004), 18,pp 435-448.
47. Skoog, D.A., Holler, F.J. et Nieman, T.A., « Principes d'analyse instrumentale », Edition De Boeck University, Paris, (2003) ,945P.
48. Tranchant, J., Arpinaud, P., Prevote, A., Serpinet, J., Vergnol, A. et Witier, P., « Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse », Edition Masson, Paris, (1995), 700P.
49. Richard, H. et Multon, J.L., « Les arômes alimentaires », Edition Tec & Doc Lavoisier, Paris,(1992),439P.
50. Cavalli, J.F., « Caractérisation par C.P.G/IK, C.P.G/SM et R.M.N.du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar », thèse de doctorat, Université de Corse, France, (2002), 261P.

51. Sommerard, Jean.Charles., « Parfums de confidences : l'Aromathérapie sensorielle », Edition Terre d'hommes, Albigny sur Saône, (2008) ,178P.
52. Seguin, E., Orecchion, A., Chestem, A. et Paris, M., « Le préparateur en pharmacie dossier 2 : Botanique, pharmacognosie, phytothérapie, homéopathie », Edition Tec & Doc, Paris, (2001), pp 141-153.
53. Sallé, Jean.Luc., « Le totum en phytothérapie », Edition Frison-Roche, Paris, (1991), pp 12-35.
54. Chebli, B., Achouri, M., Idrissi, Hassani.L.M. et Hmamouchi, M., « Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* », Journal of Ethnopharmacology, (2003), vol 89 issue 1, pp 165-169.
55. Edris, A.E., « Pharmaceutical and therapeutical potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review», Phytotherapy Research, (2007), vol 21, pp 3086323.
56. Porter, N., « Essential oils and their production », Crop & Food Research, (2001), n°39.
57. Vargas, I., Sanz, I. and Prima-Yufer, E., « Antimicrobial and antioxidant compounds in the non volatile fraction of expressed range essential oil», Journal of food protection, (1991), vol,62, n°8,pp929-932.
58. Zambonelli, A., D'Aurelio, A.Z., Severi, A., Benvenuti, E., Maggi, L. and Bianchi, A., «Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oil of *thymus vulgaris* L», Journal of Essential Oil Research,(2004), Vol 16, n°1,pp 69-74.
59. Bilgrami, K.S., Sinha, K.K. and Sinha, A.K., «Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion and garlic extracts», Indian Journal of Medical Research,(1992), vol 96, pp, 171-175.
60. Bousbia, Nabil., « Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym et Romarin). Etude de leurs activités antimicrobiennes », thèse de magister en Sciences agronomiques option Sciences alimentaires, Ecole Nationale Supérieur d'Agronomie-El Harrach, Alger, (2004), 182P.
61. Adam, Géraldine., Wittner, Laurence. et Mandigon, Catherine., « Les épices de la santé », Edition Ambre, Dijon-Quetigny, (Août 2003), 318P.

62. Speck, Brigitte., Fotsch, Ursula.Christian. et Wacker, Susan., « Connaissance des herbes », EGK, Caisse de Santé, Newsletter Lausanne (Aout 2008), 4P.
63. Jourdain, Daniel., « Dictionnaire des plantes médicinales », Edition Quebecor, Québec, (2008), 195P.
64. Vokou, D., Kokkini, S. and Bessière, J.M., « Geographic variation of Greek *Oregano (Origanum vulgare ssp. Hirtum)* essential oil », Biochem Systematics and ecology, (1993), 21, pp 287-295.
65. Simpson, Michel.G., « Plant systematic », Edition Elsevier academic press, California, (2006), 590P.
66. Carlier, Vivianne., « Herbier médicinal. 35 plantes de santé à herboriser », Edition Aubanel, Genève, (2005), 203P.
67. Baba.Aïsa, Farid., « Les plantes médicinales en Algérie », Edition Bouchène et Ad Diwan, Alger, (1991), 181P.
68. Thurzova, L., « Les plantes-santé qui poussent autour de nous », Edition Bordas, Paris, (1985), 263P.
69. Paris, R.R. et H, Moïse., « Précis de matière médicale », Tome III, Edition Masson et Cie, (1071), 509P.
70. Chiej, Roberto., « Les plantes médicinales », Edition Solar, Guide vert, Paris, (1982), 445P.
71. Cornillot, Pierre., « Guide pratique des remèdes naturels », Edition Selection du Reader's Digest, Paris, (1985), 334P.
72. Galbert, Elizabeth., « Gros plan plantes de santé », Edition Nathan, Paris, (1998), 257P.
73. Bezanger-Beauquesne, L., Pinkas, M., Tork, M. et Trotin, F., « Plantes médicinales des régions tempérées », Edition Maloine S.A, Paris, (1980),439P.
74. Quezel, P. et Santa, S., « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques », Tome II, Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, (1963), 600P.
75. Rodet, H.J.A., « Botanique agricole et médicale ou étude des plantes », Editeur C, Baillet, Paris, (1872), 1078P.
76. Peter, K.V., « Handbook of herbs and spices », Volume 2 Edition CRC Press, Cambridge, (2004), 365P.

77. Eetswaart, J. H., « A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae) », Editor Leiden botanical series, V 4, Boston (1980), 153P.
78. Skoula, M. et Harborne, J.B., « The taxonomy and chemistry of *Origanum* », Medicinal and Aromatic Plants Series-Industrial Profiles, vol.25, London, (2002), Taylor & Francis, pp 67-108.
79. Greuter, W., Burdet, H.M. et Long, G., « Conservatoire de jardin botanique de la ville de Genève», Edition Med-Checklist, vo 3, 1986.
80. Melpomene, Skoula. and al., « Exudate flavones and flavanones in *Origanum* species and their interspecific variation», Biochemical Systematics and Ecology, (2008), 36, pp 646-654.
81. Goetz, Paul., Paris, Michel. et al., « Phytothérapie la santé par les plantes», Edition Vidal, Bobigny, (2007), 447P.
82. Ochoa, Leon.Raul.Hernandez., « Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné solvant /actif d'origine végétale », thèse de Doctorat en sciences des procédés, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, (2005), 225.
83. Le Page, Rosenn. et Meudec, Gérard., « L'abc du potager geste par geste», Edition Rustica, Paris (février 2002), 240P.
84. Kokkini, S., « Proceedings of the IPIGRI international workshop of *Oregano* », Editeur S.Padulosi, Rome, (1997), 182P.
85. Hazzit, M., Baaliouamer, A., Leonor, M. et Faleiro, M.Graa. Miguel., « Composition of essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algéria and their antioxidant and antimicrobial activities», Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2006), 54(17), 6314-6321.
86. Veres, K., Varga, E. et al., « Investigation of the composition and stability of the essential oils of *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*(link) Eetswaart », Chromatographia, (2003), 57, pp 95-98.
87. Filippo D'Antuono, L., Galletti, Guido.C. and Bocchinis, Paola., « Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from north Mediterranean area( Liguria region, northern Italy)», Annals of Botany, (2000), 86, 471-478.
88. Radusiene, J., Ivanauskas, L., Janulis, V. and Jakstas, V., « Composition and variability of phenolic compounds in *Origanum vulgare* from Lithuania», Biologija, (2008), Vol 54, Nr1, pp 45-49.

89. Mockutė, D., Judpėntienė, A. and Bernotienė, G., « Volatile constituents of cultivated *Origanum vulgare* L. inflorescences and leaves», Chemija, (2004), T 15, Nr 1, pp 33-37.
90. Spiridon, E.Kintzios., « Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia* (Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles)», Taylor & Francis, New York, (2002), 267P.
91. Jackson, Betty.P. and Snowdon, Derek.W., « Atlas of microscopy of medicinal plants, culinary herbs and spices », Belhaven press, London,(1990), 265P.
92. Svoboda, Katerina.P. and Svoboda, Tomas.G., « Secretory structures of aromatic and medicinal plants», Polly M Syred, UK (2000), 60P.
93. Stahl-Biskup, E. and Sàez, F., « Thyme. The genus *Thymus*», Taylor & Francis, (2002), 330P.
94. Festy, Danièle., « Ma bible des huiles essentielles», Edition Leduc.S, Paris,(2007), 549P.
95. Leung, Albert. and Foster, Stevan., « Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics», second edition, editor John, Willey & sons, USA, (1995), 688P.
96. Khan, Ikhlas.A. and Abourashed, Ehab.A.,« Leung's encyclopedia of common natural ingredients, used in food, drugs and cosmetics», third edition, editor John Wiley & sons, New Jersey, ( 2010), 810P.
97. Fabrocini, V.C., « Comment se soigner avec l'aromathérapie», Edition De VEcchi, Paris, (1997), 97P.
98. 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 Biotechnology,(16 May 2008), Vol 7 (10), pp 1563-1570.
99. Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker,P. et Prost, M.,« Stress oxydant et pathologies humaines», La presse médicale,(2001), 30, pp 1076-1081.
100. Koechlin-Ramonatxo, C., « Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory deseases », Nutrition Clinique et Métabolique,(2006), 20,pp 165-177.



101. Favier, A., « Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique», l'Actualité Chimique, (2003), pp 108-115.
102. Hadi, M., « La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques», thèse de doctorat en Sciences option Pharmaco-chimie, Université Louis Pasteur, (2004), 155P.
103. Baser, K.Hüsnü.Can. and Buchbauer, Gerhard., «Handbook of essential oils : Science, Technology and Applications», editors Taylor & Francis, USA(2010), 975P.
104. Milbury, Paul.E. and Richer, Alice.C., « Understanding the antioxidant controversy », Edition Praeger, London, ( 2008), 174P.
105. Halliwell, B. et Whiteman, M., « Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results means? », British Journal of Pharmacology, (2004), 142, pp 31-32.
106. Bartosz, G., « Generation of reactive oxygen species in biological systems», Comments on Toxicology, (2003), 9, pp 5-21.
107. Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P. et Delattre, J., « Radicaux libres et anti-oxydants », Biochimie Pathologique : aspects moléculaires et cellulaires, Flammarion, Paris, (2003), pp 59-81.
108. Meziti, Asma., « Activité antioxydante des extraits de graines de *Nigella sativa* L : Etudes in vitro et in vivo », thèse de magister en Biochimie appliquée, option molécules bioactives, Université El Hadj Lakhdar, Batna, (2009), 105P.
109. Kohen, R. and Nyska, A., « Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidant, redox reactions and methods for their quantification», Toxicologic Pathology, (2002), 30, pp 620-650.
110. Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K. and Defraigne, J.O., « Physiological action of antioxidant defences », Nutrition Clinique et Métabolisme, (2002), 16, pp 233-239.
111. Martinez-Cayuela, M., « Oxygen free radicals and human disease », Biochimie, (1995), 77: pp 147-161.
112. Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P. et Prost, M., « Stress oxydant et pathologies humaines », La presse Médicale, (2001), 30, pp 1076-1081.

113. Sohal, R.S., Mockett, R.J. and Orr, W.C., « Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis», Free Radical Biology & Medicine,(2002), 33, pp 575- 586.
114. Mohammadi, Zohra., « Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen », thèse de magistère en biologie option produits naturels, activités biologiques et synthèse, Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen, (2006), 155P.
115. Hale, A.L., « Screening potato genotypes for antioxidant activity, Identification of the responsible compounds, and differentiating Russet Norkotah strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis » , Office of Graduate Studies of Texas A & M University, Texas, (2003), Genetics, 155P.
116. Sherwin, E.R., « Antioxidants for vegetable oils», Journal of American oil chemical Society, (1976), Vol, 53, pp 430-436.
117. Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M., « Antioxidant in food: practical applications», Edition Woodhead, (2000), 388P.
118. Cohen, M.,« Stress oxidant, glycation protéique, vieillissement et maladies liées à l'âge », La Phytothérapie Européenne, (2002), Vol 6, pp 18-26.
119. Braga, P.C., Dal Sasso, M., Culici, M., Gasastri , L ., Marceca , M.X. et Guffanti, F.F., « Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems », Pharmacology, (2006), Vol, 76, pp 61-68.
120. Pauli, A., « Antimicrobial properties of essential oil constituents », international journal Aromatherapy, (2001), 11, 126-133.
121. Fabian, D., Sabol, M., Domaracké, K. and Bujnéková, D., « Essential oil- their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability», Toxicology in vitro, (2006), 20, 1435-1445.
122. Kalembe, D. and Kunicka, A., « Antibacterial and antifungal properties of essential oils», Current Medicinal Chemistry, (2003), 10, pp: 813-829.
123. Courvalin, Patrice., Leclerq, Roland. et Bongen, Edouard., « Antibiogramme », Edition ESKA , 2<sup>ème</sup> édition, Paris, (2006), 693P.
124. Kechkar, Madina., « Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne », thèse de Magister en microbiologie appliquée option Biotechnologies microbiennes, université Mentouri, Constantine, (2008), 99P.

125. Andrews, J. M., « The development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing », Journal of Antimicrobial Chemotherapy, (2001), Vol 48, Suppl. S1, pp 29-42.
126. Helander, I.M., Alakomi, H.L. and al., « Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram- bacteria », Journal of Agriculture Food Chemistry, ( 1998), 46, pp 3590-3595.
127. Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N. and al., « A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol», Journal of Applied Microbiology, (2001), 91(3): pp 453-462.
128. Cox, S.D., Mann, C.M. and al., « The mode of microbial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*(tea tree oil) », Journal of Applied Microbiology, (2000), 88(1): pp 170-175.
129. Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G. and al., « In vivo antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils », Letters in Applied Microbiology, (1999), 29(2), pp 130-135.
130. Hermal, C., « Activité bactériostatique de sept émulsions d'HE et de deux associations d'émulsions d'HE », Faculté de pharmacie, Université de Montpellier, (1993), 1, 87.
131. Valnet, J., Duraffourd, C.H., Duraffourd, P. et Cilapraz, J., « L'aromatogramme nouveaux résultats et essais d'interpretation sur 268 cas cliniques », Plant Med Phytother, (1978), 12, pp 43-52.
132. Carson, C.F and Riley, T.V., « Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* », Journal applied Bacteriology, (1995), 78(3), pp 264-269.
133. Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U. and Ilcim, A., « Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *thymus revolutus celak* from Turkey », Journal. Ethnopharmacology, (2001), 76(2): pp 83-186.
134. Balchin, Lis.M., Hart, S.L. and Deans, S.G., « Pharmacological and antimicrobial studies on different tea ( *Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or *Manuka Kunzea ericoides* or *Knuka*), originating in Australia and New Zealand », Phytotherapy Research, (2000), 14(8), : 623-629.
135. Franchomme, P., « L'aromatologie à visée anti-infectieuse », Phytomedecine, (1981), 1 : pp 25-47.

136. Lee, K.H., Huang, E.S., Pagana, J.S. and Geissman, T.A., « Cytotoxicity of sesquiterpenes lactones », *Cancer Research*, (1971), 31: pp 1649-1654.
137. Tantaoui-Elaraki, A., Ferhout, H. and Errifi, A., « Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus Broussonettii*, *T.zygis* and *T.satureioides* », *Journal Essential Oil Research*, (1993), 5: pp 45-53.
138. Harkenthal, M., Reichling, J., Geiss, H.K. and Saller, R., « Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kanuka oil and eucalyptus oil », *Pharmazie*, (1999), 54(6): pp 460-463.
139. Kandil, O., Radwan, N.M., Hassan, A.B., Amer, A.M., El-Banna, H.A. and Amer, W.M., « Extracts and fractions of *Thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities », *Journal Ethnopharmacology*, (1994), 44(1): pp 19-24.
140. Rhayour, Khadidja., « Etude du mécanisme de l'action bactericide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* », thèse de doctorat national, Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc, ( 2002), 170P.
141. Dorman, H.J.D. and Deans, S.G., « Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils », *Journal of Applied Microbiology*,(2000), 88(2), pp: 308-316.
142. Bennis, S., Chami, F.S, et al., « Surface altération of *Saccharomyces cereviseae* induced by thymol and eugenol », *Letters in Applied Microbiology*,(2004), 38, pp: 454-458.
143. Walsh, S.E., Maillard, J.Y. and al., « Activity and mechanism of action of selected biocidal agents on Gram-positive and –negative bacteria », *Journal of Applied Microbiology*, (2003), 94(2), pp: 240-247.
144. Fauchère, J.L. et Avril, J.L., « Bactériologie générale et médicale », Edition Ellipses, Paris, (2002), 365P.
145. Zaika, L.L., « Spices and herbs-Their Antimicrobial Activity and its Determination », *Journal of Food Safety*, (1988),9(2), pp: 97-118.
146. Belaïche, P., « L'aromatogramme :Traité de phytothérapie et d'aromathérapie », Edition Maloine,(1979), Tome1, pp : 200-204.
147. Beylier-Maurel, M.F., « Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie », *Rivista Italiana*, E.P.P.O.S, (1976), 58, pp : 283-286.

148. Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G., « Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils », international Journal of Food Microbiology, ( 2002), Vol 74 (1), pp: 101-109.
149. Giamperi, L., Fraternali, D. and Ricci, D., « The in vitro action of essential oils of different organisms », Journal Essential Oil Research, (2002), 14 (4), pp: 312-318.
150. Davidson, P.M. and Parish, M.E., « Methods for testing the efficacy of food antimicrobials», Food Technologies, (1989), Vol 43, pp: 148-155.
151. Deans, S.G. and Ritchie, G., « Antimicrobial properties of plants essential oils », Journal of Food Microbiology, (1987), Vol 5, pp: 165-180.
152. Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, J.A., Preston, J.F. and Wei, C.I., « Antimicrobial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes », Journal of Food Science, (1995), Vol 60 ( 6), pp: 1364-1374.
153. Martini, Marie-Claude., « Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie », Edition Tec & Doc, (2<sup>ème</sup> édition), Paris,(2006), 411P.
154. Padrini, F. et Lucheroni De Vecchi, M.T., « Le grand livre des huiles essentielles », Edition De Vecchi, Paris, (2003), 206P.
155. Le HIR, A., « Pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication des médicaments», Edition Masson, Paris, (2001), 402P.
156. Trott, Alexander.T., « Wounds and lacerations : emergency care and closure », Edition Elsevier Mosby, Pensylvanie (USA), (2005), 336P.
157. Crickx, B., « Les grandes fonctions de la peau », Annales Dermatologie Venereol, (2005), 132 : 8S49-68.
158. Meaume, S., Teot, L. et Dereure, O., « Plaies et cicatrisations », Edition Masson,(Novembre 2005), 480P.
159. Sambou, Mariama., « Enquêtes ethnopharmacologiques en milieu Diola (Casamance) exemples de 78 plantes médicinales Senegalaises utilisées dans la thérapeutique des plaies et brulures », thèse de Docteur d'état en Pharmacie, Université Cheikh Anta Diop De Dakar, (1998), 132P.
160. Goetz , Paul., « La phytocosmétologie thérapeutique », Edition Springer-Verlag, Paris, (2007), 257P.

161. Fonteneau, Jean-Marie. et Klusiewicz, P., « Travaux pratiques de préparation et de conditionnement des médicaments », Edition Porphyre, Wolters Kluwer, France, 2008, 281P.
162. Le Hir, A., Chaumeil, J.C. et Brossard, D., « Pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication des médicaments », Edition Masson, Paris, (2009), 382P.
163. Hamimeche, M., « Relation végétation- avifaune dans le secteur Est (Hammam Melouane) du Parc National de Chréa (Wilaya de Blida) », thèse de magister en sciences agronomiques option biodiversité et biotechnologies végétales, Institut National Agronomiques, El Harrach-Alger, Juillet 2007, [file:///E:/Donn%C3%A9es%20Disque%20D/th%C3%A9ses/http\\_cyberdoc.ina.dz\\_8070\\_sdx\\_ina\\_these\\_ina\\_2007\\_hamimeche\\_md\\_html\\_sdx\\_hamimeche\\_md.html](file:///E:/Donn%C3%A9es%20Disque%20D/th%C3%A9ses/http_cyberdoc.ina.dz_8070_sdx_ina_these_ina_2007_hamimeche_md_html_sdx_hamimeche_md.html).
164. Prat, R., « Expérimentation en biologie et physiologie végétales : trois cents manipulations », Edition Quæ, Hermann editeurs, Paris(2007), 296P.
165. Itoua-Apoyolo, C.M., Abderamane, M., Ouamba, J.M., Matokot, L. et Mvila, C.A., « Caractérisation chimique des huiles essentielles extraites de *Chenopodium Ambrosioides L.*, de *Eucalyptus Citriodora Hook* et effets biologiques sur *Caryedon Serratus OL. (Coleoptera-Bruchidae)* », Annales université Marien Ngouabi, Congo, (2003), 4(1), 12P.
166. Cuendet, M., Hostettmann, K et Potterat, O., « Iridoid glycosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei* », Helvetica chimica acta, (1997), Vol 80 (4), pp 1144-1152.
167. Burits, M. et Bucar, F., « Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil », Phytotherapy research, (2001), 14, pp 323-328.
168. Oyaizu, M., « Studies of product of browning reaction prepared from glucose amine», Japan Journal of Nutrition, (1986), 44, 307-315.
169. Haddouchi, F., Lazouni, H.A., Meziane, A. et Benmansour, A., « Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanessi Bois & Reut* », Afrique Science, (2009), 05(2), pp 246-259.
170. Chikhoun, Amirouche., « Huiles essentielles de Thym et d'Origan », thèse de magistère en Agronomie option sciences alimentaires, Institut National Agronomique El Harrach, Alger, (2007), 178P.

171. Meena, M.R. et Sethi, V., « Antimicrobial activity of the essential oils from spices », Journal of Food Science and Technology Mysore, (1994), 31, pp 68-70.
172. Ela, M.A., El-Shaer, N.S. et Ghanem, N.B., « Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils », (1996), 51, pp 993-995.
173. Mebarki, Noudjoud., « Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanessi* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne », thèse de magistère en génie des procédés chimiques et pharmaceutiques option industrie pharmaceutique, Université M'hamed Bougara, faculté des hydrocarbures et de la chimie, Boumerdes, 2010, 185P.
174. Rowe, C R., Sheskey, P J and Quinn M E., « Handbook of pharmaceutical excipients », Phamaceutical Press and American Pharmacists Association, Washington, 2009, 888P.
175. Mautrait, C. et Raoult, R., « La préparation : mode d'emploi officine, soustraction et BP », Edition Porphyre, Wolters Kluwer, France, 2009, 468P.
176. Boukhatem, Mohamed Nadjib., « Extraction, caractérisation des huiles essentielles du *Geranium Rosat* et formulation d'une pommade à effet cicatrisant », thèse de magistère en Biotechnologies végétales, Université Saad Dahleb, faculté des sciences agro-vétérinaire et biologique, Blida, 2010, 106P.
177. Anonyme., « Pharmacopée européenne », 4<sup>ème</sup> édition, strasbourg, 2002.
178. Cohen, Y. et Pradeau, D., « Analyse pratique du médicament », Edition Cachan médicales internationales, 1992, 1067P.
179. Pourrat, A., Arvouet-Grand, A., Lejeune, B., Bastide, P., Privat, A.M et Legret, P., « Extrait de propolis : II Etude de la cicatrisation de plaies chez le lapin », Journal de Pharmacie de Belgique, (1993), 48, 3, pp 171-178.
180. Werker, E., Putievsky, E. and Ravid, U., « The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L », Annals of Botany, (1985), volume 55, issue 6, pp 793-801.
181. Baser, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Houmani, Z. and Abed, L., « Composition of the essential oil of *origanum floribundum* Munby from Algeria », Journal Of Essential Oil Research,( 2000),12, pp 753-756.
182. Houmani, Z., Azzoudj, S., Naxakis, G. and Melpomeni, Skoula., « The essential oil composition of Algerian Zaâtar: *Origanum spp* and *Thymus spp* »,

- Journal Of Herbs, Spices & Medicinal Plants,(2002), volume 9, issue 4, pp 275-280.
183. Hamrouni Sellami, I., Maamouri, E., Chahed, T., Aidi Wannas, W., Kchouk, M, E. et Marzouk, B., « Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) », Industrial Crop and Products, (2009), 30, pp 395-402.
184. Kpoviessi, D.S.S., Accrombessi, G.C., Kossouh, 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.
185. Kango, C., Sawalihou, B.E-H., Kone, S., Koukoua, G. et N'Guessan, Y T., « Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* », Comptes Rendus Chimie, (2004), 7, pp1039-1042.
186. Kabouche, A., Kabouche, Z. and Bruneau, C., « Analysis of the essential oil of *thymus numidicus* (Poiret) from Algeria », Flavour and Fragrance Journal, (2005), 20, pp 235-236.
187. Salgueiro, L. R. et al., « Antifungal activity of the essential oil of *thymus capitellatus* against *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte strains », Flavour and Fragrance Journal, (2006), 21, pp 749-753.
188. Cozzani, S. et al., « Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium* subsp. *Capitatum* (L.) from Corsica », Flavour and Fragrance Journal, (2005), 20, pp 436-441.
189. Su, Y.C. et al., « Analysis of leaf essential oils from the indigenous five conifers of Taiwan », Flavour and Fragrance Journal, (2006), 21, pp 447-452.
190. Mechergui, K. et al., « Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *Glandulosum* (Def) letsvaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity », Journal Science Food Agriculture, (2010), 90, pp 1745-1749.
191. Bousmaha, L. et al., « Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentate* L. from Algeria », Flavour and Fragrance Journal, (2006), 21, pp 368-372.



192. Rodrigues, F.S.L.M., « Composition of the leaf, flower and fruit volatile oils of *Pittosporum tobira*(Thunb.) W.T.Aiton grown in three locations in Portugal », Flavour and Fragrance Journal, (2007), 22: pp 311-316.
193. Miguel, M.G. et al., « Effect of volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *Th. Mastichina*, *Th. Carnosus* and *Thymbra capitata* in sunflower oil », Nahrung Food, (2003), 47: n°6, pp 397-402.
194. Belhattab, R. et al., « *Origanum glandulosum* Desf. Grown wild in Algeria : essential oil composition and glycosidic bound volatiles », Flavour and Fragrance Journal,(2005), 20 : pp 209-212.
195. Antunes, T. et al., « Micromorphology of trichomes and composition of essential oil of *Teucrium capitatum* », Flavour and Fragrance Journal, (2004), 19: pp 336-340.
196. Dob, T. et al., « Studies of the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut »,The International Journal of Aromatherapy, (2006), 16, pp 95-100.
197. Casanova, J. et al., « Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliates* (Desf.) Benth. ssp.eu-ciliatus Maire from Algeria », Journal of Essential Oil Research, (2007), 19, pp 490-493.
198. Aggoune, K. et Harfi, B., « Huiles essentielles de Thym et d'Origan : composition chimique et activité antimicrobienne», thèse d'ingénieur en sciences agronomique, Institut National Agronomique, El Harrach Alger, 2006,98P.
199. Ruberto, G., Baratta, M.T., Sari, M. and Kaabeche, M., « Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf », Flavour and Flagrance Journal, (2002), vol 17, pp 251-254.
200. Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. and Khosnoodi, M., « In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss », Food control, (2007),18,pp 800-805.
201. Loizzo, M.R. et al., « Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils », Food Chemistry, (2009), 117, pp 174-180.

202. Fadli, S. et Kessi, A., « Composition et activité des huiles essentielles du thym et de l'origan : *Thymus mumidicus poiret* et *Origanum floribundum Munby* », thèse d'ingénieur en sciences agronomique, Institut National Agronomique, El Harrach Alger, (2005), 92P.
203. Kaci, M. et Alloun, K., « Huiles essentielles et extraits d'*Origanum floribundum* et de *Ruta montana* : composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne », thèse d'ingénieur en sciences agronomique, Institut National Agronomique, El Harrach Alger, (2010), 143P.
204. Challal, R., « Etude comparative entre deux méthodes d'extraction (l'hydrodistillation et l'hydrodiffusion assistée par micro-onde et gravité) et caractérisation de l'huile essentielle d'origan (*Origanum vulgare subsp Glandulosum*) », thèse d'ingénieur en sciences agronomique, option sciences alimentaires, université Saad Dahlab de Blida, (2009), 95P.
205. Billerbeck, V.G., Roques, C., Vanière, P. et Marquier, P., « Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles », Revue Hygiène, (2002), volume X, n°3, pp 248-251.
206. Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. et al « Antimicrobial activity of mint essential oils », Journal of Agricultural and Food Chemistry, (1995), 43, pp 2384-2388.
207. Haddouchi, F. et Benmansour, A., « Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques », Les Technologies de Laboratoire, Janvier-Février 2008, N°8, pp 20-27.
208. Prescott, L M., Harley, J.P. et Klein, D A., « Microbiologie », Edition de Boeck & Larcier, s.a, (2003), Bruxelles, 1137P.
209. Deans, S.G. et Ritchie, G., « Antibacterial properties of plant essential oils », Journal of Food Microbiology, (1987), 5, pp 162-180.
210. Belgin, Cosge., Arzu,Turker., Arif, Ipek., Gurbuz, Bilal. and Naset, Arslan., « Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) letsvaart, an endemic species to Turkey », Molecules, (2009), 14, pp 1702-1712.
211. Sari, M., Biondi, D.M. et al., « Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf », Flavour and Fragrance Journal, (2006), 21, pp 890-898.

212. Ultee, A. et al., « The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus* », Applied and Environmental Microbiology, (2002), 68, pp 1561-1568.
213. Walsh, S.E. et al., « Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram positive and Gram negative bacteria », Journal of Applied Microbiology, (2003), 94, pp 240-247.
214. Didry, N. et al., « Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination », Pharmazie,(1993), 48: pp 301-304.
215. Sivropoulou, A. et al., « Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum essential oils* », Journal of Agricultural and Food Chemistry, (1996), 44: pp 1202-1205.
216. Adiguzel, A. et al., « Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* on foodborne bacteria and fungi », Czech J Food Sci, (2006), vol 25, n° 2: pp 81-89.
217. Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F. et Abdelouahid, D.E., « Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie », Phytothérapie, (2008), 6 : pp 153-159.
218. Shunying, Zhu. et al., « Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum* », Journal of Ethnopharmacology, (2005), 96, pp 151-158.
219. Oussalah, M. et al., « Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E coli* O 157: H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* », Food Control, (2007), 18, pp 414-420.
220. Oussou, K.R. et al., « Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne », European Journal of Scientific Research, (2008), vol 24, n°1, pp 94-103.
221. Anonyme., « AFNOR, antiseptiques et désinfectants », 2<sup>ème</sup> édition, (1989), recueil des normes françaises (version anglaise et française).
222. Upadhyay, N.K. et al., « Safety and healing efficacy of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil on burn wounds in rats », Food and Chemical Toxicology, ( 2009), 47, pp 1146-1153.
223. GABE, M., « Techniques histologiques », Edition Masson et Cie, 1968, 1113P.

## APPENDICE A

### ► Liste des abréviations, symboles et conventions :

AFNOR	Association Française de Normalisation
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine Triphosphate
BHA	Butyl Hydroxy Anisol
BHT	Butyl hydroxy Toluène
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication des médicaments
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de Carbone
CPG/SM (ou CG/SM)	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au Spectromètre de Masse
CT	Coupe transversale
DL50	Dose Létale 50%
DPPH	2-2 Diphépyl-1-Picryl Hydrazyl
EOR	Espèces Oxygènes Réactives
HCl	Acide chlorhydrique
HE	Huiles Essentielles

HECT	Huiles Essentielles Chémotypées
HD	Hydrodistillation
IA	Indice d'Acide
IE	Indice d'Ester
IPC	Indice d'irritation Primaire Cutanée
IR	Indice de Rétention
KOH	Hydroxyde de Potassium
LPS	Lipopolysaccharides
MH	Mueller Hinton
NaCl	Chlorure de Sodium
NaOH	Hydroxyde de Sodium
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfate de Sodium Anhydre
OF	<i>Origanum floribundum</i>
OG	<i>Origanum glandulosum</i>
PA	Principe actif
PAM	Plantes Aromatiques et Médicinales
Ph. Eur	Pharmacopée Européenne
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
SAB	Gélose Sabouraud
SOD	Superoxyde Dismutase
TSA	Gélose Trypticase de Soja
VRBG	Gélose Glucosée Biliée au cristal violet et au rouge neutre

## APPENDICE B

### ► Composition des milieux de culture utilisés:

- MUELLER-HINTON gélosé (MH) : (g/l)

Infusion de viande de bœuf .....02, 0 g

Hydrolysate acide de caséine.....17, 5 g

Amidon.....01, 5 g

pH : 7,4

Autoclaver pendant 15 min à 115°C.

- SABOURAUD gélosé simple (SAB) : (g/l)

Néopeptone .....10 g

Glucose.....20 g

Agar.....20 g

pH : 5 - 5,6

Autoclaver pendant 15 min à 115°C.

- TRYPTONE-SOJA-AGAR (TSA) : (g/l)

Tryptone.....15 g

Peptone de Soja.....5 g

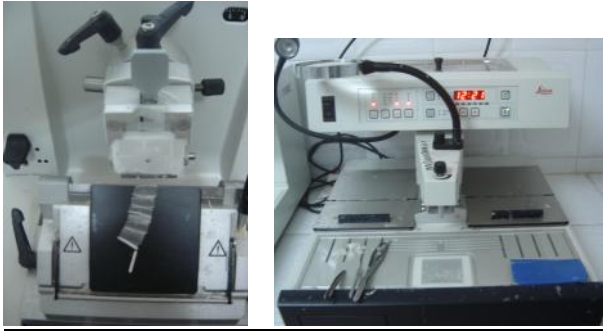
Chlorure de Sodium.....5 g

Agar.....15 g

Autoclaver pendant 15 min à 121°C.

## APPENDICE C

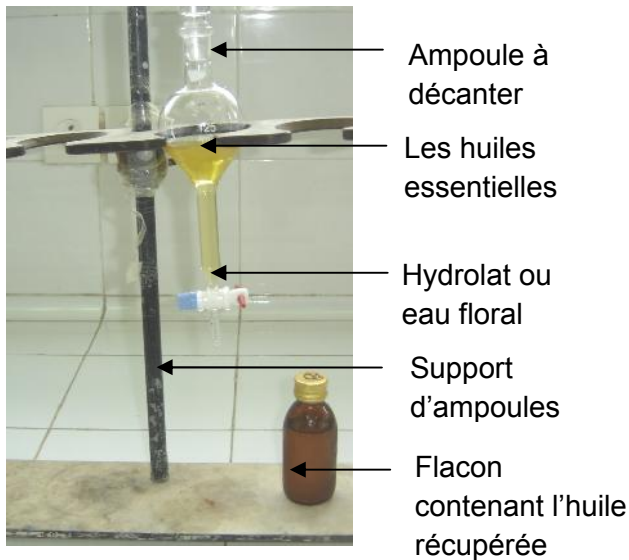
### ► Appareillage utilisé et tests biologiques



C1 : Confection de blocs de paraffine et coupes au microtome (original, 2010).

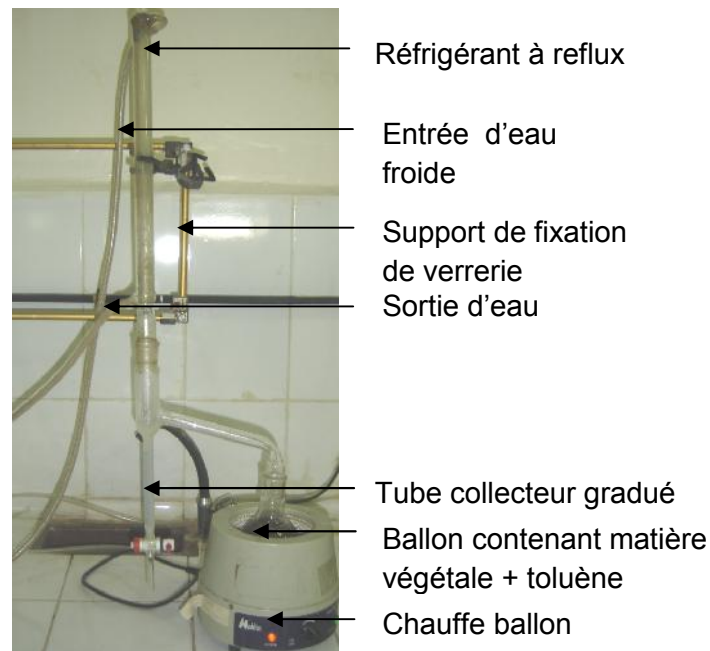


C2 : Alambic semi industriel (original, 2009).



C3 : Séparation d'HE par décantation

(Original, 2009).



C4 : Appareil Dean et Starck (Original, 2009).

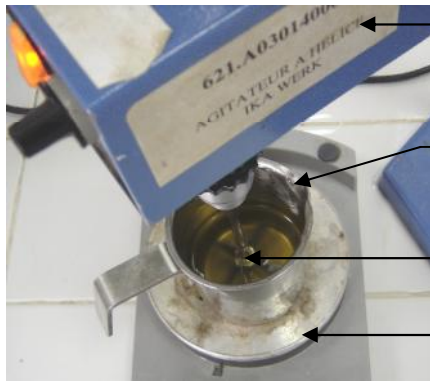


- ← Réfrigérant
- ← Entrée d'eau froide
- ← Erlen-meyer récupérant le distillat
- ← Sortie d'eau
- ← Ballon contenant le matériel végétal
- ← Chauffe ballon

C5 : Hydrodistillation à l'échelle de laboratoire (Original, 2009).

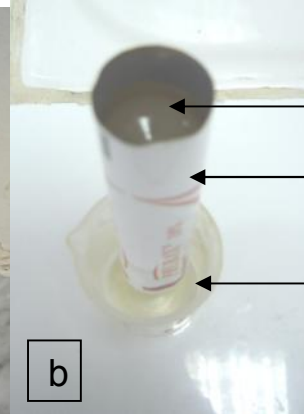


C6 : Appareil CG/SM



- ← Agitateur à hélice
- ← Bêcher en inox contenant la pommade
- ← Turbine
- ← Plaque chauffante

C7 : Préparation de la pommade (Original, 2010).



- ← Pommade
- ← Tube en aluminium ouvert
- ← Bêcher en verre

C8 : Conditionnement de la pommade a et b (Original, 2010).



C9 : Injection intramusculaire de Ketamine et Acepromazine



C10 : Mobilisation du rat sur la paillasse



## APPENDICE D

### ► Protocoles utilisés

#### 1. Technique histologique (coupe au microtome)

La technique nécessite 3 étapes fondamentales :

##### 1.1 Fixation des organes

Pour la fixation de nos organes (feuilles, tiges et pétioles), nous avons utilisé le mélange formol alcool, acide acétique (FAA) composé de :

- ✓ 8 volumes d'éthanol 70°.
- ✓ 1 volume de formol.
- ✓ 1 volume d'acide acétique glacial.

Un passage sous vide dans le dessiccateur pendant une heure est nécessaire, pour permettre une meilleure pénétration du fixateur dans les tissus tout en éliminant l'eau des cellules et éviter ainsi une désorganisation des structures.

Le temps de fixation est de 24 heures à 48 heures selon la taille et la consistance des organes fixés.

Après fixation, les organes sont trempés dans l'éthanol 70° qui assure une bonne conservation des organes pendant plusieurs mois (GABE, 1968) [223].

##### 1.2. Inclusion des organes dans la paraffine

Cette étape nécessite de faire une déshydratation progressive des pièces à l'éthanol dans un premier temps, puis une imprégnation par le toluène, avant l'inclusion des organes dans la paraffine fondue (GABE, 1968) [223].

###### 1. 2.1. Déshydratation

C'est le traitement par l'éthanol de concentration progressivement croissante qui représente le mode de déshydratation traditionnelle, utilisée pour amorcer l'extraction de l'eau ou autres produits (GABE, 1968) [223].

Cette étape consiste à éliminer toute l'eau ou le fixateur qui se trouve dans les tissus destinés à être inclus dans la paraffine.

La déshydratation consiste à mettre les organes dans des bains d'éthanol à raison d'une heure comme suit :

- Ethanol 95° pendant 1 heure.
- Ethanol 95° pendant 1 heure.
- Ethanol 100° pendant 1 heure.
- Ethanol 100° pendant 1 heure.
- Ethanol 100° pendant 1 heure ou 1 nuit.

Pour les organes à consistance dure, le passage dans des bains de butanol est nécessaire après passage dans de l'alcool 70° et 90° comme suit :

- Ethanol 70° pendant 1 heure.
- Ethanol 95° pendant 1 heure.
- Ethanol 95° pendant 30 minutes.
- Butanol pendant 24 heures.
- Butanol pendant 24 heures.

Après les 3 bains de butanol, le passage à l'éthanol absolu est nécessaire :

- Ethanol 100° pendant 1 heure.
- Ethanol 100° pendant 1 heure.
- Ethanol 100° pendant 1 heure.

### 1.2.2. Imprégnation

Cette étape permet d'éliminer toute trace d'éthanol, et cela pour une meilleure pénétration de la paraffine dans les tissus.

L'imprégnation par le toluène (hydrocarbure benzénique) est recommandée pour la rapidité de sa pénétration ; celle-ci se traduit par un éclaircissement des pièces (GABE, 1968) [223].

L'imprégnation se déroule en plongeant les fragments d'organes dans :

- Toluène + alcool (1V/1V) pendant 30 minutes.
- Toluène pur pendant 1 heure.
- Toluène pur pendant 1 heure.
- Toluène pur pendant 1 heure.
- Toluène + paraffine fondue (1V/1V), pendant 30 minutes à  $58 - 60 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
- Paraffine pendant 1 heure à  $58 - 60 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

- Paraffine pendant 1 heure à  $58 - 60 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
- Paraffine pendant 1 nuit ou plus à  $58 - 60 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

### 1.2.3. Inclusion à la paraffine

L'inclusion se fait à la paraffine pure qui est coulée à chaud  $65 \pm 4^{\circ}\text{C}$  (température de fusion de la paraffine) dans un modèle de moule :

#### Le modèle cassette

Ce système consiste à remplir les moules métalliques de paraffine neuve fondue, dans laquelle on dépose délicatement l'échantillon puis on place les cassettes (en plastique) identifiées sur les moules de manière à ce que cette paraffine pénètre dans les perforations des cassettes, le durcissement se fait une plaque réfrigérante pendant 10 minutes.

Nous obtenons à la fin des blocs et des cassettes ou les fragments sont parfaitement inclus, le passage à l'étape suivante nécessite une heure d'attente au minimum (GABE, 1968) [223].

### 1.3. Confection des coupes et coloration

Les organes inclus dans la paraffine sont débités en coupes sériées à l'aide d'un microtome manuel (type leica) à une épaisseur de  $7\mu\text{m}$ .

Les rubans de coupes réalisées sont placés sur des lames propres mises préalablement dans de l'éthanol  $95^{\circ}$  puis séchées à l'aide d'un papier hygiénique, numérotées avec un diamant puis étalées par une eau gélatineuse préparée par 0,1 g de gélatine en poudre dans 100 ml d'eau distillée.

Les lames sont mises ensuite sur une plaque chauffante réglée à  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  afin d'étaler les coupes en évitant leur plissement (GABE, 1968) [223].

#### 1.3.1. Déparaffinage

Le déparaffinage est une étape qui précède la coloration. Il consiste à éliminer la paraffine des tissus pour faciliter la pénétration des colorants.

Cette étape est assurée par trois bains de toluène :

- Un bain de toluène pur pendant 15 minutes sur plaque chauffante.
- Un bain de toluène pur pendant 10 minutes sur plaque chauffante.
- Un bain de toluène pur pendant 10 minutes sur plaque chauffante.

#### 1.3.2. Réhydratation

La réhydratation a pour but de préparer les coupes à l'action du colorant miscible à l'eau, elle consiste à faire passer les coupes dans :

- Trois bains d'alcool absolu pendant 10 minutes chacun.
- Un bain d'alcool pur/formol (4v/1v) pendant 5 minutes.

Les coupes sont ensuite rincées à l'eau courante (GABE, 1968) [223].

### 1.3.3. Coloration

Nous avons utilisé la double coloration Carmino-vert, cette méthode permet de différencier les tissus. Les tissus lignifiés ou subérifiés apparaissent en vert et les tissus à parois cellulodiques en rouge [164].

#### 1.3.3.1. Double coloration carmino-vert

La technique a pour protocole suivant :

- Placer les coupes 10 à 20 minutes dans l'hypochlorite de sodium (eau de javel 12°) pour la destruction des structures cytoplasmiques.
- Laver abondamment à l'eau.
- Laver dans l'acide acétique dilué à 1% pendant 15 minutes (mordançage qui a pour but d'augmenter l'affinité des colorants).
- Laver à l'eau courante pendant 5 à 10 minutes.
- Colorer 5 minutes dans le carmin aluné.
- Laver à l'eau courante pendant 5 à 10 minutes.
- Colorer 30 secondes au vert d'iode.
- Après lavage à l'eau courante, les coupes sont montées entre lame et lamelle puis observées au microscope photonique.

## 2. Technique histologique (coupe à main levée)

Les coupes transversales à main levée sont effectuées sur les feuilles fraîches et tige. Les organes sont disposés entre deux tranches de moelle de sureau pris entre le pouce et l'index, afin d'obtenir des coupes très fines pour pouvoir les observer au microscope photonique.

### 2.1. Double coloration vert de méthyl- rouge congo

- les coupes sont plongées dans l'eau de Javel à 12° pendant 10 à 15 min pour vider les cellules,

- Après rinçage à l'eau courante 5 à 10 min, les coupes sont traitées par l'acide acétique (10%) pendant 1 à 2 min pour faciliter la diffusion des colorants,
- Elles sont ensuite lavées à l'eau courante 5 à 10 min et placées dans le vert de méthyle pendant 15 à 20 min,
- Les coupes sont rincées à l'eau courante 5 à 10 min puis plongées dans le rouge Congo 15 à 20 min,
- Après lavage à l'eau courante, elles sont montées entre lame et lamelle puis observées au microscope photonique.

### 3. Les étapes de la cinétique de l'extraction de l'HE :

- Introduire 100g de matière végétale dans un ballon de 2 litres, ajusté avec 2/3 d'eau qui est relié à réfrigérant.
- Chauffer jusqu'à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon.
- Le mélange de vapeur d'eau et d'huile essentielle formée est condensé et refroidi à une température ambiante.
- Récupérer les distillats dans des Erlen-Meyers à des intervalles de temps réguliers.
- Séparer l'HE de la phase aqueuse par décantation à l'aide d'une ampoule à décanter en ajoutant un solvant organique (le diéthyl-éther).
- En cas d'une mauvaise séparation des deux phases, ajouter du chlorure de sodium (NaCl).
- Eliminer la phase aqueuse et récupérer la phase organique dans des tubes à essais préalablement pesés par filtration à travers un papier filtre contenant un sel de sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) qui sert à piéger les molécules d'eau.
- Laisser les tubes à essai ouverts à l'air libre, à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'à évaporation totale de l'éther diéthylique, puis peser.
- Ces prélèvements séquentiels de distillats effectués à différents intervalles de temps, nous ont permis de tracer la courbe du rendement en fonction du temps d'extraction.

## APPENDICE E

### ► Entretien des animaux de laboratoire testés

Les animaux utilisés lors des tests pharmaco-toxicologiques proviennent de l'animalerie du CRD de SAIDAL d' El Harrach

Caractéristiques des animaux utilisés :

- Lapins Albinos, de souche néo-zélandaise.  
Nombre = 06, sexe : mâle, poids : 2,5-3Kg.
  
- Rats Albinos de race Whistar  
Nombre = 20, sexe : mâle et femelle, poids : 200g.  
Habitat :
  - Température : 22-25°C.
  - Humidité : 50-60%
  - Eclairage : artificiel (12/24heures)

Nourriture :

Elle est sous forme de granulés originaires de l'ONAB (Office Nationale d'Alimentation du Bétail) dont la composition est la suivante :

Composés	%
Humidité	14 max
Matière minérale	8 min
Matière protéique	22 min
Matière grasse	2,5 min
Cellulose	3 max
Vitamine A	12300 ul/Kg
Vitamine B	20mg/Kg
Fer	76mg/Kg
Magnésium	25 g/Kg

Abreuvement :

Il se fait par l'eau de robinet (fraîche remplie dans des bouteilles en plastiques de 500ml.

Contention :

Elle doit être ferme pour éviter toute morsure et maîtriser ainsi les réactions, parfois vives de l'animal. Le rat est pris par la base de sa queue et mise sur le grillage de la cage, puis saisie au niveau de la peau du dos près des oreilles. Donc dans ce cas, l'animal ne sera plus capable de tourner la tête pour mordre.

Marquage :

Il est nécessaire pour l'identification des animaux. Il se fait par un marqueur coloré sur la queue pour le rat et sur les oreilles pour le lapin.



E1 : Lapin Albinos (souche Néozélandaise), Original, 2010.



E2 : Rat Albinos (Whistar), Original, 2010.

## APPENDICE F

### ► Tableaux illustrant quelques résultats

Appendice F.1 : Pouvoir de piégeage du radical DPPH (%  $\pm$  écart type) par les HE (*d'Origanum floribundum* , BHT et Tocophérol) en fonction des concentrations (mg/l) des échantillons

Echantillons/Concentrations	100	200	400	600	800	1000
HE <i>d'Origanum floribundum</i>	18,7 $\pm$ 1.2	23,9 $\pm$ 0,5	40,1 $\pm$ 1,4	71,4 $\pm$ 0,6	81,0 $\pm$ 0,8	79,9 $\pm$ 0,2
BHT	73,2 $\pm$ 0,9	80,6 $\pm$ 0,3	84,8 $\pm$ 0,5	86,4 $\pm$ 0,6	88,8 $\pm$ 0,3	91,1 $\pm$ 0,1
Tocophérol	73,5 $\pm$ 0,8	74,0 $\pm$ 0,8	76,0 $\pm$ 1,1	76,2 $\pm$ 1,0	78,4 $\pm$ 0,2	80,2 $\pm$ 1,1

Appendice F.2 : Test du pouvoir réducteur du BHT, acide ascorbique et l'HE *d'Origanum floribundum* .

Concentration en mg/l	<sup>a</sup> Absorbance à 700nm			
	HE d'Origan	Tocophérol	BHT	Acide ascorbique
100	0,59 $\pm$ 0,015	0,87 $\pm$ 0,013	1,43 $\pm$ 0,02	1,34 $\pm$ 0,043
200	0,97 $\pm$ 0,027	1,55 $\pm$ 0,037	1,66 $\pm$ 0,056	1,43 $\pm$ 0,013
400	1,31 $\pm$ 0,002	1,79 $\pm$ 0,043	1,75 $\pm$ 0,056	1,49 $\pm$ 0,019
600	1,46 $\pm$ 0,003	1,94 $\pm$ 0,047	1,81 $\pm$ 0,025	1,55 $\pm$ 0,054
800	1,45 $\pm$ 0,003	1,98 $\pm$ 0,003	1,80 $\pm$ 0,027	1,61 $\pm$ 0,027
1000	1,51 $\pm$ 0,004	2,03 $\pm$ 0,01	1,98 $\pm$ 0,014	1,71 $\pm$ 0,011

<sup>a</sup> Les résultats sont moyennes  $\pm$  écart type de trois mesures.



APPENDICE F3 : Sensibilité des souches étudiées à l'HE d'*Origanum floribundum*  
(diffusion en mm par disque  $\pm$  Standard déviation).

Souche	ATCC	Gram	HE d'Origan
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	40,66 $\pm$ 1,53
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	35,66 $\pm$ 2,30
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	27 $\pm$ 1
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	28,66 $\pm$ 2,08
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	45 $\pm$ 2,64
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	37,33 $\pm$ 2,08
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	35,33 $\pm$ 2,52
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	47 $\pm$ 2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	26,17 $\pm$ 1,26
<i>Candida albicans</i>	24433		53 $\pm$ 3,46
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601		36,33 $\pm$ 3,21

Appendice F.4 : Evaluation de la surface et profondeur de cicatrisation chez le rat, pour chaque produit appliqué, en fonction du temps (jours).

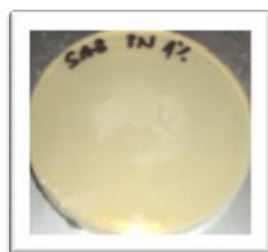
produit testé		Aucun trait	Excipient	HE ORI 0,5%	HE ORI 1%	HE ORI 2%	MADECA 1%
jour 0	Suface	19,62 ± 0,00	19,62 ± 0,00	19,62 ± 0,00	19,62 ± 0,00	19,62 ± 0,00	19,62 ± 0,00
	Profondeur	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
jour 2	suface	17,76 ± 2,15	16,09 ± 4,99	14,64 ± 3,14	13,38 ± 3,71	11,58 ± 1,70	14,64 ± 3,14
	profondeur	4,00 ± 0,00	3,5 ± 0,71	3,4 ± 0,42	3,3 ± 0,44	3,33 ± 0,29	3,3 ± 0,45
jour 6	suface	11,84 ± 4,35	10,45 ± 2,65	10,36 ± 3,01	9,18 ± 2,28	6,34 ± 1,25	8,16 ± 2,46
	profondeur	3,25 ± 0,5	3 ± 0,5	2,8 ± 0,27	2,8 ± 0,45	2,33 ± 0,58	2 ± 0,00
jour 8	suface	6,72 ± 3,26	5,54 ± 1,90	3,925 ± 1,43	3,49 ± 0,79	3,27 ± 1,57	3,49 ± 0,79
	profondeur	3,00 ± 0,00	2,25 ± 0,29	1,9 ± 0,22	1,2 ± 0,45	1 ± 0,00	1,6 ± 0,55
jour 12	suface	4,45 ± 2,27	2,22 ± 0,79	1,65 ± 0,97	0,78 ± 0,00	0,59 ± 0,34	1,37 ± 0,54
	profondeur	2,33 ± 0,58	1,5 ± 0,5	0,9 ± 0,22	0,8 ± 0,27	0,66 ± 0,29	0,8 ± 0,27
jour 14	suface	3,27 ± 1,57	1,90 ± 1,18	1,45 ± 1,03	0,43 ± 0,32	0,15 ± 0,1	1,17 ± 0,54
	profondeur	2,00 ± 0,00	1 ± 0,5	0,6 ± 0,00	0,5 ± 0,00	0,42 ± 0,14	0,7 ± 0,27

Appendice F.5 : Taux de contraction des surfaces des plaies traitées par la pommade à l'HE, Madécasol, excipient et placebo.

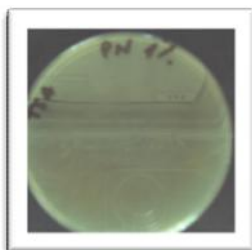
<b>produit testé</b>	<b>Aucun trait</b>	<b>Excipient</b>	<b>HE ORI 0,5%</b>	<b>HE ORI 1%</b>	<b>HE ORI 2%</b>	<b>MADECA 1%</b>
<b>% de réduction j2</b>	<b>9,50%</b>	<b>18%</b>	<b>25,40%</b>	<b>31,80%</b>	<b>41%</b>	<b>25,40%</b>
<b>% de réduction j6</b>	<b>39,67%</b>	<b>46,75%</b>	<b>47,20%</b>	<b>53,20%</b>	<b>67,69%</b>	<b>58,40%</b>
<b>% de réduction j8</b>	<b>65,76%</b>	<b>71,77%</b>	<b>80%</b>	<b>82,22%</b>	<b>83,33%</b>	<b>82,22%</b>
<b>% de réduction j12</b>	<b>77,33%</b>	<b>88,66%</b>	<b>91,60%</b>	<b>96%</b>	<b>96,10%</b>	<b>92,10%</b>
<b>% de réduction j14</b>	<b>83,34%</b>	<b>90,33%</b>	<b>92,60%</b>	<b>97,80%</b>	<b>99,23%</b>	<b>94%</b>

## APPENDICE G

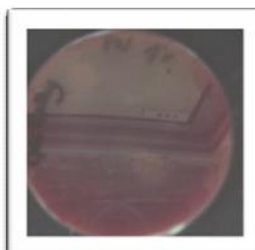
### ► Résultats du contrôle microbiologique de la pommade dermique



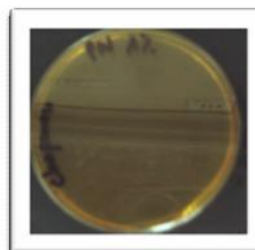
a : Recherche des levures



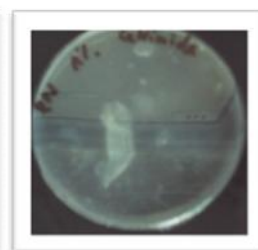
b : Recherche des mésophiles



c : Recherche des *Escherichia coli*



d : Recherche des staphylocoques



e : Recherche des pseudomonases

Figure 3.45 : Recherche de bactéries et levures par le test de pureté de la pommade dermique à base d'HE d'*Origanum floribundum*  
a, b, c, d et e : absence de colonies microbiennes (Original, 2010).

## APPENDICE H

### ► Etude statistique

#### 1. Activité antimicrobienne d'HE d'*Origanum floribundum* :

##### 1.1 influence des souches microbiennes sur les zones d'inhibition (ANOVA 1):

- L'essai :
  - variable Y : zone d'inhibition ;
  - Facteur A : souche microbienne ;
  
- Hypothèse testée :
  - $H_0^A$ : Absence d'action du facteur A sur Y (la souche n'agit pas sur la zone d'inhibition).
  
- Règle de décision :
  - On accepte  $H_0^A$  si les valeurs de significations sont supérieures à 0,05, dans le cas contraire, l'hypothèse  $H_0^A$  Est rejetée.
  
- ❖ Analyse de la variance :

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Souche	2168,803	10	216,880	40,723	,000
Erreur	117,167	22	5,326		
Total corrigé	2285,970	32			

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, et en se référant aux règles de décision, on rejette l'hypothèse :  $H_0^A$

Donc au seuil de 5% :

Le facteur A agit : la souche microbienne a un effet significatif sur la zone d'inhibition et entre les autres souches microbiennes étudiées.

❖ Test de Newman-Keuls :

Lorsque l'hypothèse  $H_0^A$  est rejetée, on effectue ce test pour classer les Moyennes du facteur (souches microbiennes).

	Souche	Sous-ensemble			
		1	2	3	4
Student-Newman-Keuls <sup>a,b</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26,1667			
	<i>Enterococcus faecium</i>	27,0000			
	<i>Micrococcus luteus</i>	28,6667			
	<i>E coli</i>		35,3333		
	<i>Bacillus cereus</i>		35,6667		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		36,3333		
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>		37,3333		
	<i>Bacillus subtilis</i>		40,6667		
	<i>Staphylococcus aureus</i>			45,0000	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			47,0000	
	<i>Candida albicans</i>				53,0000

Les résultats du test Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des souches microbiennes selon leur sensibilité:

*Candida albicans* > *Klebsiella* ; *Staphylococcus* > *Bacillus subtilis*; *Bordetella* ; *Saccharomyces* ; *Bacillus cereus* ; *E coli* > *Micrococcus* ; *Enterococcus* ; *Pseudomonas* .

## 2. Activité antioxydante d'HE d'Origan :

### 2.1. Influence de la nature de l'antioxydant sur l'activité antioxydante :

#### 2.1.1. Activité du piégeage du radical DPPH :

- L'essai :
  - Variable Y: Activité de piégeage du radical DPPH ;
  - Facteur A : Nature de l'antioxydant avec 03 possibilités (HE, BHT et Tocophérol) ;
  - Facteur B : Concentrations avec 06 possibilités (100, 200, 400, 600, 800, 1000mg/l) ;
- Hypothèses testées :
  - $H_0^A$  : Absence d'action du facteur A (pas de différence en terme d'activité de piégeage du DPPH entre les trois antioxydants) ;
  - $H_0^B$  : Absence d'action du facteur B (pas de différence en terme d'activité de piégeage du DPPH entre les 06 concentrations) ;
  - $H_0^{A*B}$  : Absence d'interaction entre A et B.
- Règles de décision :
  - On accepte  $H_0^A$ ,  $H_0^B$  et  $H_0^{A*B}$  si les valeurs de signification sont supérieures à 0,05, dans le cas contraire, les hypothèses  $H_0^A$ ,  $H_0^B$  et  $H_0^{A*B}$  sont rejetées.

#### ❖ Analyse de la variance :

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Antioxydant	9775,308	2	4887,654	8079,296	,000
Concentration	6746,162	5	1349,232	2230,282	,000
Antioxydant * Concentration	6085,920	10	608,592	1006,003	,000
Erreur	21,779	36	,605		
Total corrigé	22629,169	53			

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, et en se référant aux règles de décision, on rejette les hypothèses :  $H_0^A$ ,  $H_0^B$  et  $H_0^{A*B}$ . Donc au seuil de 5%

- Le facteur A agit : la nature de l'antioxydant a un effet significatif sur l'activité de piégeage du radical DPPH ;
- Le facteur B agit : la concentration a un effet significatif sur le pouvoir de piégeage du radical DPPH ;
- Le facteur A x B agit : l'interaction entre les deux variables qualitatives : « nature de l'antioxydant » et « concentration » : a un effet significatif sur l'activité de piégeage du radical DPPH

❖ Test de Newman-Keuls :

Lorsque l'hypothèse  $H_0$  est rejetée, on effectue ce test pour classer les moyennes pour chaque facteur.

a) Facteur « Nature de l'antioxydant » :

	Antioxydant	N	Sous-ensemble		
			1	2	3
Student-Newman-Keuls	HE	18	52,5009		
	Tocopherol	18		76,3694	
	BHT	18			84,1158

Les résultats du test de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des antioxydants, selon leurs activités de piégeage du DPPH

BHT > Tocophérol > HE

b) Facteur « Concentration » :

	Concentration	Sous-ensemble					
		1	2	3	4	5	6
Student-Newman-Keuls	100 mg/l	55,1324					
	200 mg/l		59,4856				
	400 mg/l			66,9054			
	600 mg/l				77,9928		
	800 mg/l					82,7328	
	1000 mg/l						83,7234



Les résultats du test de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des concentrations, selon leurs activités de piégeage du DPPH/ 1000 > 800 > 600 > 400 > 200 > 100mg/l

### 2.1.2. Pouvoir réducteur :

- L'essai :
  - Variable Y: Pouvoir réducteur :
  - Facteur A : Nature de l'antioxydant avec 04 possibilités (HE, BHT, Tocophérol et Vitamine C) ;
  - Facteur B : Concentration avec 06 possibilités (100, 200, 400, 600, 800 et 1000 mg/l) ;
- Hypothèses testées :
  - $H_0^A$  : Absence d'action du facteur A (pas de différence en terme de pouvoir réducteur entre les quatre antioxydants) ;
  - $H_0^B$  : Absence d'action du facteur B (pas de différence en terme de pouvoir réducteur entre les 06 concentrations) ;
  - $H_0^{A*B}$  : Absence d'interaction entre A et B.
- Règle de décision :
  - On accepte  $H_0^A$ ,  $H_0^B$  et  $H_0^{A*B}$  si les valeurs de signification sont supérieures à 0,05 dans le cas contraire, les hypothèses  $H_0^A$ ,  $H_0^B$  et  $H_0^{A*B}$  sont rejetées.

### ❖ Analyse de la variance

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Antioxydant	3,028	3	1,009	1146,117	,000
Concentration	4,519	5	,904	1026,286	,000
Antioxydant * Concentration	1,128	15	,075	85,422	,000
Total corrigé	8,718	71			

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, et en se référant aux règles de décision, on rejette les hypothèses :  $H_0^A$ ,  $H_0^B$  et  $H_0^{A*B}$ .

Donc au seuil de 5% :

- Le facteur A agit : la nature de l'antioxydant a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.
- Le facteur B agit : la concentration a un effet significatif sur le pouvoir réducteur ;
- Le facteur A x B agit : L'interaction entre les deux variables qualitatives « nature de l'antioxydant » et « concentration » a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

❖ Test de Newman-Keuls :

Lorsque l'hypothèse  $H_0$  est rejetée, on effectue ce test pour classer les moyennes pour chaque facteur.

a- Facteur « nature de l'antioxydant » :

	Antioxydant	Sous-ensemble			
		1	2	3	4
Student-Newman-Keuls <sup>a,,b</sup>	HE	1,2153			
	Vit C		1,5214		
	Tocopherol			1,6951	
	BHT				1,7361

Les résultats de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des antioxydants, selon leurs pouvoirs réducteurs :

BHT > Tocophérol > VitamineC (acide ascorbique) > HE.

b- Facteur «Concentration»:

	Concentration	Sous-ensemble				
		1	2	3	4	5
Student-Newman-Keuls <sup>a,,b</sup>	100 mg/l	1,0577				
	200 mg/l		1,4022			
	400 mg/l			1,5834		
	600 mg/l				1,6920	
	800 mg/l				1,7099	
	1000 mg/l					1,8068

Les résultats de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des concentrations selon leur pouvoir réducteur :

1000 > 800 ; 600 > 400 > 200 > 100mg/l.

### 3. Activité cicatrisante de l'HE d'Origan :

#### 3.1 Influence de l'agent cicatrisant sur % de contraction de plaie (% de réduction de plaie) :

- L'essai :
  - Variable Y : % de contraction de plaie ;
- Facteur A : Agent cicatrisant avec 06 possibilités (Placebo, excipient, Madecazol ® 1%, pommade à 0,5% HE, à 1% et à 2%) ;
- Facteur B : Temps avec 06 possibilités (0, 2, 6, 8, 12 et 14 jours) ;
- Hypothèses testées :
  - $H_0^A$  : Absence d'action du facteur A (pas de différence en terme de réduction de plaie entre les 06 agents cicatrisants ;
  - $H_0^B$  : Absence d'action du facteur B (pas de différence en terme de réduction de plaie entre les 06 jours proposés ;
  - $H_0^{A*B}$  : Absence d'interaction entre A et B.
- Règles de décision :

On accepte  $H_0^A$ ,  $H_0^B$  et  $H_0^{A*B}$  si les valeurs de signification sont supérieures à 0,05, dans le cas contraire, les hypothèses  $H_0^A$ ,  $H_0^B$  et  $H_0^{A*B}$  sont rejetées.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Cicatrisants	3549,167	5	709,833	6,836	,000
Temps	128285,256	5	25657,051	247,084	,000
Cicatrisants * Temps	1436,910	25	57,476	0,5554	,950
Erreur	7476,446	72	103,840		
Total corrigé	140747,779	107			

:

❖ Analyse de la variance

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessous, et en se référant aux règles de décision, on rejette les hypothèses :  $H_0^A$  ,  $H_0^B$  et  $H_0^{A*B}$  .

Donc au seuil de 5% :

- Le facteur A agit : l'agent cicatrisant a un effet significatif du point de vue statistique sur la contraction de plaie ;
- Le facteur B agit : le temps a un effet significatif sur la contraction de plaie ;
- Le facteur A X B agit : L'interaction entre les deux variables qualitatives : « agent cicatrisant » et « temps » : n'a pas d'effet significatif sur la contraction de plaie ;

❖ Test de Newman-Keuls :

Lorsque l'hypothèse  $H_0$  est rejetée, on effectue ce test pour classer les moyennes pour chaque facteur.

a- Facteur « agent cicatrisant » :

Cicatrisants		Sous-ensemble		
		1	2	3
Student-Newman-Keuls	Placebo	46,5500		
	Excipient	52,4450	52,4450	
	HE à 0.5%		55,9439	55,9439
	MADECA à 1%		58,6178	58,6178
	HE à 1%		59,6150	59,6150
	HE à 2%			64,7122

Les résultats de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement des agents cicatrisants selon leur pouvoir de contraction de plaie :

Pommade (P) à 2% d'HE ; P à 1% d'HE ; Madécasol ® 1% ; P à 0,5% d'HE > Excipient > Placebo.

b- Facteur « temps » :

Temps		Sous-ensemble				
		1	2	3	4	5
Student-Newman-Keuls	0 jour	,0000				
	2 jours		24,9222			
	6 jours			52,1639		
	8 jours				77,3378	
	12 jours					90,6256
	14 jours					92,8344

Les résultats de Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement du temps selon la contraction de plaie (cicatrisation).

14 jours (j) ; 12 j > 8 j > 6 j > 2 j > 0 j.

## APPENDICE I

### ► Glossaire

**Alambic** : appareil permettant la distillation.

**Antibactérien** : qui détruit les bactéries

**Antifongique** : qui détruit les champignons

**Anti-inflammatoire** : qui élimine l'inflammation

**Antioxydant** : produit qui empêche l'oxydation

**Antiparasitaire** : qui détruit les parasites

**Antirhumatismale** : qui guérit le rhumatisme

**Antiseptique** : qui détruit tous les germes

**Antispasmodique** : qui empêche l'action des spasmes

**Antitoxique** : qui élimine les toxines

**Antivenimeuse** : qui neutralise l'action des venins

**Antiviral** : qui détruit les virus

**Aseptisation aérienne** : stérilisation de l'air

**Bactéricide** : qui tue les bactéries

**Bactériostatique** : qui inhibe la multiplication et croissance des bactéries

**Biofilm** : formation d'un film pelliculaire de résistance chez certaines bactéries

**Bractée** : est une pièce florale en forme de feuille faisant partie de l'inflorescence

**Chromatographie préparative** : la chromatographie préparative est considérée, dans une large mesure, comme un processus de purification utilisant la chromatographie en phase liquide.

**Décanté** : la décantation est une opération de séparation mécanique, sous l'action de la gravitation, de plusieurs phases non-miscibles et de densités différentes.

**Décombante** : qui, s'élevant d'abord, retombe ensuite vers la terre comme Tige décombante.

**Diurétique** : qui augmente la sécrétion de l'urine.

**DL50** : dose létale à 50 %, Cet indicateur mesure la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population animale donnée (souvent des souris ou des rats) dans des conditions d'expérimentation précises.

**Emarginée** : qualifie une feuille très légèrement échancrée au sommet.

**Essence** : substance volatile et aromatique extraite des plantes par distillation

**Exserte** : qualifie un organe qui dépasse largement, qui fait saillie hors de la structure dans laquelle il est inséré.

**Flétan** : stimulant cellulaire

**Fleurs disjointes** : fleurs détachées

**Fongicide** : qui tue les champignons

**Fongiostatique** : qui inhibe la croissance des champignons

**Génotoxique** : se dit d'une substance ou d'un rayonnement qui peut compromettre l'intégrité du génome.

**Halo d'inhibition** : zone entourant le disque d'aromatogramme marquant l'inhibition de croissance des microorganismes étudiés.

**Hermaphrodite** : se dit d'un être vivant portant les organes reproducteurs des deux sexes, mâle et femelle

**Histamine** : est une molécule de signalisation du système immunitaire, c'est un médiateur chimique synthétisé

**Hydrolat** : appelé aussi eau de distillation ou eau florale, obtenu par distillation de la plante aromatique et séparé d'huile essentielle surnageant

**Létale** : qui peut provoquer la mort



**Microbiocide** : qui tue les microorganismes

**Miscible** : désigne usuellement la capacité de divers liquides à se mélanger.

**Ovaire supère** : les pièces florales sont insérées en dessous de l'ovaire dans ce cas la fleur est hypogyne. Dans le cas contraire l'Ovaire infère: les pièces florales sont insérées au-dessus de l'ovaire, la fleur est alors épigyne.

**Papille** : désigne une petite excroissance charnue, la plupart du temps formée par un tissu épithélial

**Plante annuelle** : est une plante herbacée qui vit moins d'un an, et qui accomplit donc son cycle de vie en une seule année

**Plante bisannuelle** : est une plante qui accomplit son cycle de vie en deux années

**Prostrée** : étant couchée sur le sol

**Rameuse** : qui est partagé en branches

**Sédatif** : qui a une action dépressive sur le système nerveux central et qui entraîne un apaisement, une relaxation, une réduction de l'anxiété et une somnolence

**Sessile** : en botanique, lorsqu' une feuille, une fleur ou un fruit sont directement attachés à la tige, sans pétiole ou pédoncule

**Sous-ligneuse** : se dit d'une plante dont la tige n'est ligneuse qu'à la base

**Stimulus** : désigne tout ce qui est de nature à déterminer une excitation chez un organisme vivant

**Suint** : matière animale grasse qui sort du corps des moutons et qui s'attache à leur laine.

**Synergie** : un phénomène par lequel plusieurs facteurs agissant ensemble créent un effet plus grand que la somme des effets attendus s'ils avaient opéré indépendamment, ou créent un effet que chacun d'entre eux n'aurait pas pu obtenir en agissant isolément.

**Toxicité aiguë** : est la toxicité induite par l'administration d'une dose unique et massive de toxique, décrite comme la dose qui risque à 50% de tuer un être vivant. Elle est parfois notée LD<sub>50</sub>, de l'anglais Lethal Dose 50%

**Toxicité chronique** : désigne un effet nocif (chronique) résultant de doses répétées d'une substance, ou d'expositions à celle-ci, au cours d'une période relativement longue. S'emploie ordinairement pour décrire les effets observés chez des animaux d'expérience.

**Toxinogénèse** : production de toxines

**Usage topique** : utilisation locale

**Vivace** : ou plante pérenne, est une plante vivant plus de deux ans, mais qui vit souvent beaucoup plus longtemps, la limite de deux ans étant fixée pour séparer les vivaces des bisannuelles

**Volatil** : qui s'évapore facilement