

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
جامعة الجيلالي بونعامة خميس مليانة  
Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana

**Faculté des Sciences et de la Technologie**  
**Département de Technologie**



## *Mémoire de fin d'étude*

*En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en génie des procédés*  
*Spécialité : Génie Pharmaceutique*

# **Etude de l'Activité Antimicrobienne et Antioxydante des Huiles Essentielles de l'*Origanum Majorana L* de la Région d'Ain Defla**

Réalisé par :

AHMED ABD EL MALEK Nawel et YAGOUBI Feth Zhar

Devant le jury composé de :

Dr. REZALA Houria.....Présidente

M<sup>elle</sup>.ALLICHE Zahia .....Examinatrice

Dr. HACHAMA Kamel .....Encadreur

Année universitaire : 2016 / 2017

## **REMERCIEMENT**

*Le présent travail a été effectué à l'université de Khemis Milina, faculté des Science et de la technologie département de Technologie.*

*Nous remercions en premier lieu Dieu le tout puissant pour nous avoir donné la force et la volonté d'accomplir ce travail.*

*Nous aimerons, tous d'abord, exprimer à Monsieur KAMEL HACHAMA nos profonde gratitude de nous avoir dirigé dans nos recherches, pour tout son support et les orientations durant toute la réalisation de ce mémoire par ses conseils qui nous ont appris la patience.*

*Nos remerciements vont également à tous les membres de jury, pour l'intérêt qu'elles ont bien voulu porter à ce modeste travail.*

*Nos remerciements les plus sincères aussi pour tous les enseignants de mon département pour leur patience et leurs efforts au cours de notre formation de master.*

*Nous ne saurons oublier tous ceux qui, de près ou de loin, nous ont prodigué leurs encouragements et nous ont offert leurs soutiens.*

# Dédicaces

*Merci ALLAH..*

*Je dédie ce travail*

*Aux êtres les plus chers : Mes parents,*

***A mon père,***

*Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils.*

*J'espère que ce travail sera à la hauteur de tes attentes et qu'il soit l'accomplissement de tous tes efforts.*

***A ma mère,***

*Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie.*

*Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous MES CHÈRES PARENTS que je le dois, que Dieu vous garde.*

*A mes chers frères : Mohamed et Belkacem pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse*

*A mes belles sœurs : Fatima zahra, Khawla, Fettouma, Amina et Bochra*

*Mes amis : Oussama, Radia, Houda, Nihad, Wissem, Sihem,*

*Yagoubi feth ezhar*

# *Dédicace*

*Merci ALLAH...*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes parents*

*Pour vos mains qui ont tant travaillées,*

*Pour votre cœur qui m'a tant donné,*

*Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,*

*Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,*

*Pour vous qui m'avez tant aimé.*

*Pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements.*

*Que ce travail soit, pour eux, un faible témoignage de  
ma profonde affection et tendresse;*

*Mes sœurs et mes frères*

*Pour leur soutien moral, Naima, Chaima, Mohamed et Isslem*

*Mon mari et ma fille*

*Kamel et Maram*

*Toute ma famille*

*Kawthar merci pour la plante, Fedwa, Farida*

*AHMED ABD ELMALEK NAWEL*

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد التركيب الكيميائي وتقييم مضادات الأكسدة والنشاط البكتيري للزيت الأساسي (زا) المردقوش (اوريقانيوم ماجورانال). من منطقة بن علال من ولاية عين الدفلى. تم استخراج الزيوت الأساسية بالتقطير البخار، أعطى المحاصيل، 2.21 و 0.65 و 2.25٪ (وزن / وزن) على التوالي في أشهر الحصاد (فبراير ومارس وأبريل). وأظهر التحليل الكروماتوغرافي عن طريق س ج / م س وجود:

تارينان (4.71%) الفا- ثرنان (8.80%) تاربنلان (9.43%) 4- ترينبول (13.94%)

إلى جانب مركبات أخرى عند مستويات منخفضة نسبياً. أظهر النشاط المضاد للأكسدة التي يحددها اختبار د ب ب ح أن لديه إمكانات المضادة للأكسدة قوية مع اس 50 = 30 ملغ / مل. في التركيزات المدروسة، أظهر التعبير عن نتائج النشاط المضاد للبكتيريا أن الزيت الأساسي كان إيجابياً وجهاً لوجه المكورات العنقودية الذهبية والزائفة الزنجارية والسلبية ضد القولونية

### كلمات البحث:

الزيت الأساسي، س ج م س، النشاط المضاد للأكسدة، والنشاط المضاد للميكروبات، اوريقانيوم ماجورانال

## Abstract

This study aims to determine the chemical composition and to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of the *Origanum majorana* L. essential oils from the deposits of Ben Allal in Ain defla. The essential oils extraction was carried out by hydrodistillation, gave yields Of 0.65, 2.21 and 2.25% (w / w) respectively according to the vest month (February, March and April). The chromatographic analysis by GC/MS showed the presence of 4-terpinéol (13.94%), terpinolène (9.43%),  $\alpha$ -Terpinène (8.80%), Sabinène (5.14%), et  $\gamma$ -Terpinène (4.78%) accompanied other compounds at relatively low amount. The antioxidant activity determined by the DPPH test showed that the essential oils has a high antioxidant potential with  $IC_{50} = 30\text{mg/ml}$ . At the studied concentrations, the results of the antibacterial activity results expression showed that the essential oil was positive against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and negative versus *Escherichia coli*.

**Keywords:** Essential oils, *Origanum majorana* L., GC-MS, Antioxydant activity, Antimicrobial activity.

## Résumé

Cette étude a pour objectif de déterminer la composition chimique et d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle (HE) de la marjolaine (*Origanum majorana* L.) provenant de la région de Ben Allal de la wilaya de Ain defla.

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation, a donné des rendements de 0.65, 2.21 et 2.25% (p/p) respectivement selon le mois de récolte (Février, Mars et Avril). Les analyses chromatographiques par CG/SM ont montré la présence du 4-terpinéol (13.94%), terpinolène (9.43%),  $\alpha$ -Terpinène (8.80%), Sabinène (5.14%), et  $\gamma$ -Terpinène (4.78%), accompagnés d'autres composés à des teneurs relativement faibles. L'activité antioxydante déterminée par le test DPPH a montré que l'HE présente un fort potentiel antioxydant avec l'IC<sub>50</sub> = 30mg/ml. Aux concentrations étudiées, l'expression des résultats de l'activité antibactérienne a montré que l'huile essentielle était positive vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et négative contre *Escherichia coli*.

**Mots clés :** huile essentielle, *Origanum majorana* L., CG-SM, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

### **Liste des tableaux**

**Tableau 2.1 :** Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMLs.

**Tableau 3.1:** Rendement d'HE de l'*origanum majorana*.L

**Tableau 3.2 :** Influence du temps sur l'extraction de l'huile de l'*origanum majorana*.L

**Tableau 3.3 :** Caractéristiques organoleptiques d'HE de la marjolaine.

**Tableau 3.4 :** Caractéristiques physico-chimiques de l'HE de la marjolaine.

**Tableau 3.5 :** Composition chimique de l'HE de la marjolaine.

**Tableau 3.6 :** Détermination des zones d'inhibition de l'HE de la marjolaine pour les trois mois vis-à-vis les bactéries pathogènes (en cm).

**Tableau 3.7. :** Les zones d'inhibition de l'HE de la marjolaine vis-à-vis des bactéries pathogènes

**Tableau 3.8 :** Concentration minimale inhibitrice d'EH de la marjolaine.

**Tableau 3.9 :** Pourcentage d'inhibition du DPPH.



## Liste des figures

- Figure 1.1** : Photo de l'origanum majorana.
- Figure 1.2** : Structures chimiques de quelques composés phénoliques.
- Figure 2.1** : Carte géographique de région de récolte.
- Figure 2.2** : La marjolaine sèche et humide.
- Figure 2.3** : Appareil de clevenger pour l'hydro distillation.
- Figure 2.4** : La formation de deux phases.
- Figure 2.5** : Les étapes d'extraction d'HE.
- Figure 2.6** : Le pH mètre.
- Figure 2.7** : Les résultats du pH sur un papier.
- Figure 2.8** : Réfractomètre.
- Figure 2.9** : Dispositif de titrage pour définir l'indice d'acide.
- Figure 2.10** : Dispositif de titrage pour définir l'indice d'ester.
- Figure 2.11** : Chromatographie en phase gazeuse (CGMS).
- Figure 2.12** : Microscope.
- Figure 2.13** : Schéma simplifié de principe de la méthode de l'aromatogramme.
- Figure 2.14** : Schémas simplifié du principe de la méthode de l'organigramme.
- Figure 2.15** : Dépôt de disque.
- Figure 2.16** : Préparation des dilution et de DPPH.
- Figure 2.17** : Forme libre et réduite du DPPH.
- Figure 2.18** : Spectrophotomètre Uv-Visible.
- Figure 2.19** : Préparation de DPPH.
- Figure 3.1**: Influence du temps sur d'extraction d'huile de l'*origanum majorana*.
- Figure 3.2** : HE de la marjolaine extrait.
- Figure 3.3** : Virage de couleur violet sombre vers jaune pâle.
- Figure 3.4** : L'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration.
- Figure 3.5** : Evolution de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.

## 1.1. Historique

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup cherchent les remèdes normaux sans effets secondaires et bien sûr coût élevé de médecine conventionnelle [5].

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique (8000 ans avant J.C.). L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade [6].

Dans les civilisations chinoise, indienne (médecine ayurvédique) ou aztèque, on trouve la trace d'utilisations médicinales très anciennes. Le premier livre de matière médicale, le Shen Nung Ben Cao jing ("Traité des plantes médicinales de l'empereur Shen Nung"), fut rédigé vers 2900 avant J.-C. 4000 ans avant J.-C., les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner: 600 tablettes d'argiles mentionnent 1000 plantes pour leurs vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrits par les Egyptiens[6].

Le soin de la peau a commencé 3.000 ans avant naissance du Christ, quand les Egyptiens ont enregistré en forme hiéroglyphique le soin de la peau sur des peintures de mur de temple[5].

Les grands médecins grecs, dont le plus célèbre est Hippocrate (5<sup>e</sup> siècle avant J.C.), utilisaient couramment les narcotiques, les laxatifs ou des émétiques (vomitifs).

Théophraste (370-285 avant. J.-C.) classe les plantes dans son ouvrage *Historia plantarum* [7].

A l'apogée de l'empire arabe (dont les frontières allaient de l'Inde à l'Espagne), tous les documents écrits furent réunis à Bagdad dans la plus grande bibliothèque de l'époque (entre le 7<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> siècle). Les Arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie, fut l'un des grands médecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par Ibn Sina ou Avicenne (980-1037) qui écrivit le "Canon de la médecine". Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs de 1650. Ibn al Baytar (1197-1248) rédigea le très complet *Somme des Simples* : ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont un millier étaient connues des auteurs grecs [7].

## **1.2. Plantes médicinales**

D'après la X<sup>ème</sup> édition de la Pharmacopée française, les plantes médicinales "sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses". Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques

En d'autres termes nous pouvons dire qu'une plante médicinale est une plante dont un des organes, par exemple la feuille ou l'écorce, possède des vertus curatives lorsqu'il est utilisé à un certain dosage et d'une manière précise. Au Moyen Âge, on parlait de "simples" [1].

Dans le Code de la Santé Publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique [8].

### **1.2.1. Domaines d'application des plantes médicinales**

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse [9].

Il y a eu donc un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement, parce que les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable. Ainsi, une recherche de nouvelles drogues est un choix normal [8].

### **1.2.1.1. Utilisation en médecines**

- En tant que médicament pour l'homme ; exemple : en urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordres nerveux [9].
- Systèmes cardiovasculaires, ex : Flavoce est un médicament constitué par la flavone non substitué en combinaison avec la rutine et isoquercétine est utile dans le traitement de l'athérosclérose [10].
- Drogues immunostimulantes, antispasmodiques et anti-inflammatoires (Melaleuca alternifolia, Echinacea angustifolia, Chrysanthemum parthenium, Achillea millefolium, etc.) [9].
- Contre le diabète (Azadirachta indica) [7].
- Les maladies du stress, des activités antioxydantes; tels le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composé phénoliques, parmi lesquels theaflavine, le resveratrol, le gallate et epigallocatechine procyanidine, très étudié en raison de leur rôle en tant qu'agent chemopréventifs basés sur leurs capacités antioxydantes [8].
- D'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives ont été mises en évidence pour les huiles essentielles de Romarin, Sauge, Thym, Origan, Sarriette, Clou de girofle, Gingembre et Curcuma [9].
- Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire: Les produits naturels des plantes depuis des périodes très anciennes ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques ex: la quinine obtenue à partir du quinquina "Cinchona" a été avec succès employée pour traiter le malaria, l'arbre de thé (Melaleuca alternifolia) est renommé pour ses propriétés : Antibactériennes, anti-infectieux, antifongiques, antivirales aussi comme antiviral (Azadirachta indica, Aloe vera, Andrographis paniculata, Withania somnifera, Astragalus membranaceus, Curcuma longa, etc.), mais aucune plante n'est aussi efficace que les médicaments antirétroviraux pour arrêter la réplication du VIH, antibactérienne (Azadirachta indica), antifongiques (Adenocalyma alleaceum, Allium ampeloprasum, Allium ramosum, Allium sativum, Tulbaghia violacea, Capsicum annum, Capsicum chinense, Capsicum frutescens) [9].

### **1.2.1.2. En Agriculture**

L'arbre *Azadirachta indica*, qui se développe dans tout le subcontinent indien, est une des plantes médicinales les plus importantes au Bangladesh, de 12 à 18 mètres de hauteur avec un périmètre atteignant jusqu'à 1,8 à 2,4 mètres. Les huiles de cet arbre ont des utilisations dans l'agriculture dans le contrôle de divers insectes et nématodes (vers parasites) [10].

### **1.2.1.3. En alimentation assaisonnements**

Les épices et les herbes aromatiques utilisées dans l'alimentation sont pour une bonne part responsables des plaisirs de la table considérées comme condiments et aromates. La popularité des épices et herbes aromatiques a été et reste très liée à leurs propriétés organoleptiques [10].

La notion de flaveur des épices et aromates recouvre l'ensemble des perceptions olfacto-gustatives. Ces perceptions résultent de stimuli générés par une multitude de composés organiques dont certains sont volatils et constituent ce qu'on appelle en général l'huile essentielle, les autres non volatils, sont plus particulièrement responsables de la saveur et de la couleur [11].

#### **1.2.1.4. En cosmétiques**

Produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène.

Des suppléments diététiques [12].

### **1.3 Les huiles essentielles**

#### **1.3.1. Définition**

Il s'agit d'un extrait pur et naturel provenant de plantes aromatiques .Elle concentre l'essence de la plante, autrement dit son parfum. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, de consistance huileuse, très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs [11].

Il faut ainsi une très grande quantité de plantes fraîches pour obtenir quelques millilitres d'huiles essentielles [8].

On ne peut définir une essence sans définir sa méthode d'extraction.

« Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » [11].

Ce sont des produits généralement odorants, obtenus soit par entraînement à la vapeur d'eau, de végétaux ou de parties de végétaux, soit par expression du péricarpe frais de certaines citrus. Cette définition excluant les essences obtenues par d'autres procédés d'extraction [10].

#### **1.3.2. Répartition des huiles essentielles dans la plante**

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant, elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles telles que : les Conifères, les Rutacées, les Ombellifères, les Myrtacées, les Lamiacées, les Poacées. Elles sont présentes dans

différents organes végétaux producteurs, variant en fonction de la zone productrice du végétal: les sommités fleuries (lavande, menthe), dans les racines ou rhizomes (vétiver, gingembre), dans les écorces (cannelles), le bois (camphrier), les fruits (citron), les graines (Muscade) et sont contenues dans des structures spécialisées à savoir : les poils, les canaux sécréteurs et les poches [5].

### **1.3.3. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaient à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau. Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé. Elles sont pour la plupart colorées : rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclérée et de romarin officinal [11].

Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée [12].

Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) [11].

### **1.3. 4. Contrôle de qualité**

Les huiles essentielles doivent répondre à des normes analytiques, établies par des commissions nationales et internationales d'experts et imposées par les pays importateurs ou exportateurs .

Les points de contrôle à effectuer pour se prémunir de la falsification des huiles essentielles et éviter les confusions entre les différentes espèces concernent l'origine géographique, l'espèce botanique, l'organe producteur (feuilles, fleurs, fruits, écorces) et les caractéristiques physico-chimiques (couleur, odeur, densité et indice de réfraction).

Tout ceci permettra d'utiliser une appellation présente dans la nomenclature botanique et valable dans le monde entier [11].

L'Institut de Normalisation Scientifique d'Aromatologie INSA a retenu trois critères pour conférer aux huiles essentielles le label « HEBBD » : Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie [12].

Il s'agit de :

- L'espèce botanique
- L'organe producteur
- Le chémotype ou chimiotype de la plante

- **L'espèce botanique :**

Il s'agit du nom latin complet de la plante distillée à l'origine de l'extraction de l'huile essentielle. Par exemple, dans le terme « lavande », il y a plusieurs espèces dont on extrait des huiles essentielles différentes. Le nom complet sera composé par conséquent :

- Du genre : *lavandula*.
- D'une épithète qualitative : *spica, vera*.

Et parfois de la variété si elle existe : *var fragans*, étant donné que la composition et les propriétés des huiles essentielles peuvent varier d'une variété à l'autre. C'est le cas des eucalyptus où plus de 500 espèces différentes portant toutes le nom de genre *Eucalyptus* sont recensées dans le monde [12].

- **L'organe producteur (op)**

Selon l'organe producteur, l'huile essentielle peut avoir des propriétés et un usage totalement différents. C'est le cas de l'oranger amer : *citrus aurantium var.amara* qui fournit différentes huiles essentielles, l'une à partir de ses feuilles, une autre à partir de ses fleurs ainsi qu'une essence extraite de l'écorce des zestes de ses fruits. Ces 3 substances aromatiques diffèrent par leur composition, leur parfum, leurs propriétés médicinales [11].

- **Le chémotype ou chimiotype de la plante (CT)**

Il indique le composant biochimique majoritaire et distinctif présent dans l'huile essentielle. Il permet ainsi de différencier entre les huiles essentielles extraites d'une même espèce botanique mais de composition biochimique différente et par conséquent aux propriétés différentes [12].

En effet, deux plantes identiques peuvent produire des essences plus au moins différentes, selon les conditions de culture : ensoleillement, composants du sol, saison. Le chémotype est retrouvé grâce à une analyse chromatographique et spectrométrique identifiant les molécules

contenues dans l'huile essentielle. Par exemple, pour le thym (*thymus vulgaris*), l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* CT thujanol possède des propriétés anti-infectieuses avec une action stimulante et régénératrice au niveau hépatique, alors que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* CT thymol est antibactérienne mais hépatotoxique à doses élevées [12].

### **1.3.5. Les procédés d'extraction des huiles essentielles**

La quantité d'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible, voire infime. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle. L'extraction des huiles essentielles est certainement la phase la plus délicate. Elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal.

Il existe différents procédés d'extraction, mais le choix de la méthode utilisée définit obligatoirement la nature de l'essence ainsi que son éventuelle utilisation. L'entraînement par la vapeur ou l'hydrodistillation de la plante fraîche ou sèche reste la technique la plus utilisée. On distingue les procédés suivants:

#### **1.3.5.1 Extraction par expression à froid**

Il s'agit du procédé d'extraction le plus simple et le plus limité. C'est une méthode artisanale qui est totalement abandonnée. Les plantes sont pressées à froid (notamment les agrumes : citron, orange, etc.) de l'écorce ou des fruits [9].

Cette technique consiste à briser mécaniquement les poches oléifères de zestes frais d'agrumes pour libérer leur contenu aromatique. La rupture de la paroi des poches oléifères fait intervenir trois procédés [13] :

- Une technique qui agit sur le fruit entier, elle utilise des machines exerçant une action abrasive
- . - Une technique qui agit sur le fruit sans endocarpe. Elle utilise des machines exerçant une pression suffisante pour libérer l'essence.
- Un troisième procédé permet d'extraire en une seule opération l'essence et le jus sans mélanger les deux produits.

Le produit obtenu se nomme « essence » et non huile essentielle, car aucune modification chimique liée à des solvants ou à la vapeur d'eau n'a lieu.

#### **1.3.5.2 Extraction par distillation et entraînement à la vapeur d'eau**



Il s'agit de l'un des procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques les plus anciens, apporté par les Arabes au IX<sup>e</sup> siècle. Cette opération s'accomplit dans un distillateur ou « alambic ». Le matériel végétal est supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat [13].

Les parties insolubles sont séparées de l'eau par décantation pour donner l'huile essentielle [11].

#### **1.3.5.3 Hydrodistillation ou distillation à l'eau**

Le matériel végétal est en contact direct avec l'eau. L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité [10].

Cette méthode est généralement indiquée pour les huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants. Cependant, l'inconvénient majeur de cette méthode est la non maîtrise de la température du récipient contenant le mélange (eau + organes végétaux) et la modification de la couleur, de l'odeur et de la composition de l'huile essentielle au cours de la distillation [13].

#### **1.3.5.4 L'enfleurage**

L'enfleurage est une technique qui date de l'Antiquité égyptienne. Elle consiste à déposer des plantes en particulier les organes fragiles (fleurs d'oranger, pétales de rose) sur une couche de graisse animale qui se sature en essence. On épuise ensuite le corps gras par l'alcool qui récupère les senteurs et qui sera ensuite évaporé sous vide [13].

Cette technique est actuellement abandonnée au profit de l'extraction par les solvants en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite [11].

#### **1.3.5.5 Extraction par les solvants organiques**

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Etant de nature huileuse, les essences sont solubles dans les solvants organiques. Un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un

résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à «l'absolue» [12].

On utilise comme solvant organique volatil l'hexane, qui est le plus utilisé actuellement; le benzène très utilisé dans le passé mais interdit pour des raisons de toxicité ; le propane ; le toluène, etc [13].

L'extraction s'effectue en plusieurs étapes, on lave la matière avec le solvant deux à trois fois. Il semble que la presque totalité des produits odorants passe en solution dès la première extraction. Mais, étant donné que la matière traitée retient une forte proportion de la solution, il est nécessaire de pratiquer des dilutions successives avec de nouvelles charges de solvant (lavages). La matière épuisée retient une proportion importante de solvant. Il faut donc concentrer la solution en évaporant le solvant qui est recyclé pour d'autres lavages. La récupération du solvant atteint couramment 94 à 96 % de la quantité retenue [8].

De ce fait une proportion résiduelle de solvants reste dans les concrètes d'où un risque de toxicité non négligeable. Pour cette raison, cette technique est limitée à l'industrie des parfums [9].

#### **1.3.5.6 Extraction par le CO<sub>2</sub>**

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé: il s'agit du CO<sub>2</sub> en phase supercritique. L'extraction consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au delà de son point critique (P=72.8 bars et T= 31.1°C) [12].

A l'état supercritique, le CO<sub>2</sub> n'est ni liquide, ni gazeux, et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température de mise en œuvre. Les fluides supercritiques comme le CO<sub>2</sub> sont de bons solvants à l'état supercritique, et de mauvais solvants à l'état gazeux [12].

Les avantages de ce procédé sont les suivants :

- Le CO<sub>2</sub> est totalement inerte chimiquement, il est naturel, non toxique et peu coûteux[11].
- En fin de cycle, la séparation entre le solvant d'extraction et le soluté pour obtenir l'extrait est facile (simple détente qui ramène le CO<sub>2</sub> à l'état gazeux), avec une récupération quasi-totale et peu coûteuse [8].
- L'extraction des huiles essentielles par le CO<sub>2</sub> supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques [10].

Cependant l'installation industrielle de ce procédé reste onéreuse, et l'appareillage est encore envahissant.

En conclusion, il n'existe pas de procédé meilleur que d'autres. Chaque méthode possède sa propre indication selon le végétal ou la partie du végétal, et l'utilisation du produit obtenu commande ainsi que l'aspect économique qui est tout aussi important [13].

### **1.3.6. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles**

Quelque soit le domaine d'utilisation des huiles essentielles (parfumerie, cosmétique, industrie pharmaceutique et agroalimentaire), une parfaite connaissance de leur composition chimique est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Ainsi l'analyse des huiles essentielles, qui consiste en des méthodes de séparation et d'identification des composants, reste une étape importante. Cependant, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques [13].

La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et désorptions successives sur la phase fixe, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase [14].

Plusieurs méthodes existent

- **Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Il s'agit d'une technique de routine utilisée pour l'analyse rapide de fractions obtenues à la suite d'une séparation initiale. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide en plastique ou en aluminium, les substances migrent, entraînées par la phase mobile composée d'un ou de plusieurs solvants. Ensuite, le repérage des molécules s'effectue soit par ultra-violet (UV), soit par un colorant spécifique ou encore par exposition aux vapeurs d'iode (83). Cette technique, beaucoup moins performante que la chromatographie en phase gazeuse, peut être utilisée en routine pour le contrôle de qualité des huiles essentielles [14].

- **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

C'est de loin la technique la plus utilisée pour les huiles essentielles. Elle permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir).

Le principe est basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur [15].

- **Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)**

Le but de combiner entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM, après séparation chromatographique, est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique [16].

Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse [14].

L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (Ir) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres [13].

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) Cette technique est indiquée pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour effectuer des préfractionnements. Elle peut être couplée également à un analyseur de masse [14].

La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase stationnaire très fine et une phase mobile liquide circulant sous l'effet d'une haute pression. Après la séparation des différents constituants de l'échantillon, un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données [13].

- **La Résonance Magnétique Nucléaire RMN**

Parmi toutes les techniques spectroscopiques, la RMN est la technique de choix pour la caractérisation des molécules organiques ; elle permet l'accès à des informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules [14].

L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de permettre l'identification des connexions entre atomes des diverses entités tout en les situant dans l'espace les uns par rapport aux autres [14].

### **1.3.7. Toxicité des huiles essentielles**

Bien que d'origine naturelle, les huiles essentielles peuvent se révéler dangereuses pour la santé. Il est ainsi important de connaître le produit, le choisir selon des critères qualitatifs rigoureux (produit de qualité non falsifié, non contaminé par des pesticides), de respecter scrupuleusement les doses et de choisir le mode d'administration adéquat, et ce afin d'éviter la survenue d'effets indésirables, voire même des interactions avec d'autres médicaments.

Ainsi, les huiles essentielles peuvent s'avérer allergisants, photosensibilisants, cytotoxiques, irritants, néphrotoxiques, hépatotoxiques, neurotoxiques [16].

On distingue les toxicités suivantes :

- **Toxicité par voie orale :**

La majorité des huiles essentielles couramment utilisées présentent une toxicité par voie orale faible avec des doses létales à 50% (DL50) supérieures à 5 g/kg. Cependant, la Sarriette et l'Origan présentent une toxicité élevée autour des 1.4 g/kg (données observées chez l'animal), tandis que les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13 g/kg), de Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg), ainsi que l'essence de moutarde (0,34 g/kg). [17].

L'eugénoï, l'un des constituants du Thym, peut s'avérer hépatotoxique et même entraîner une insuffisance rénale chez l'enfant à doses élevées (10 ml) [17].

En effet, les accidents les plus graves sont généralement observés chez les enfants suite à l'ingestion de quantités importantes d'huiles essentielles.

- **Toxicité dermique :**

L'usage des huiles essentielles en application locale, en parfumerie ou en cosmétique, peut générer des irritations, allergies voire photosensibilisation. C'est le cas de l'huile essentielle de Thym, d'Origan, de la Sarriette qui sont connues pour leur pouvoir irritant et agressif, l'huile essentielle de Cannelle qui est dermocaustique et allergisante pour les terrains sensibles, et les essences d'agrumes (pamplemousse, citron...) qui sont photosensibilisantes par des réactions épidermiques après exposition au soleil [7].

- **Cytotoxicité :**

Certaines huiles essentielles peuvent s'avérer cytotoxiques sur les cellules animales et humaines. En effet, il a été démontré que les huiles essentielles d'Origan, de différentes variétés, présentent une forte cytotoxicité sur des cellules humaines cancéreuses [17].

Egalement, il a été démontré que les huiles essentielles de Thym et de Lavande, selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (phase liquide ou gazeuse), sont cytotoxiques sur des cellules animales (hamster) [10].

- **Neurotoxicité :**

Certaines huiles essentielles peuvent être convulsivantes et abortives suite à une utilisation prolongée. C'est le cas des huiles essentielles à thuyones (Thuya, Absinthe, Sauge officinale) qui sont neurotoxiques [17].

### **1.3.8. Activité antimicrobienne des huiles essentielles**

Les propriétés médicinales des huiles essentielles sont nombreuses : antispasmodique, expectorant, rafraîchissant, diurétique, antiseptique....

Cependant, dans ce travail, nous allons nous limiter à leurs propriétés antimicrobiennes qui constitueront l'essentiel de notre étude de recherche.

Les vertus antimicrobiennes des huiles essentielles sont bien connues et bien documentées. En effet, de nombreux travaux de recherche ont mis en évidence leur puissante activité antiseptique agissant aussi bien sur les bactéries, les champignons pathogènes que les virus leur conférant ainsi diverses indications thérapeutiques [18].

#### **1.3.8.1. Activité bactéricide et bactériostatique**

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été la plus étudiée. On distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur ces microorganismes :

- Effet bactéricide (bactéricidie) : exerçant une activité létale
- Effet bactériostatique (bactériostase) : entraînant une inhibition de la croissance.

L'activité bactériostatique est souvent plus assimilable aux huiles essentielles que l'activité bactéricide. Cependant il a été démontré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des propriétés bactéricides [19].

En effet, des dommages au niveau des cellules de différents microorganismes ont été rapportés, illustrés par microscopie électronique. Citons l'effet bactéricide des huiles essentielles riches en monoterpénols et en phénols sur *Staphylococcus aureus*, ou encore celui de l'*Origanum compactum* sur *Escherichia coli* [20].

Toutefois, cette action bactéricide des huiles essentielles sur la cellule bactérienne demeure encore insuffisamment élucidée [18].

Plusieurs mécanismes seraient mis en jeu :

- Précipitation des protéines et des acides nucléiques [19].
- Inhibition de la synthèse des macromolécules (AND, ARN, protéines et peptido-glycanes) [19].
- Inhibition de la perméabilité membranaire sélective et détérioration membranaire [18].
- Inhibition de la glycolyse et déplétion potassique [20].
- Modification de la morphologie de la cellule bactérienne [19].

- Absorption et formation d'un film autour de la cellule bactérienne avec inhibition des processus de respiration, d'absorption et d'excrétion. [19]

### **1.3.8.2. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles**

L'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dépend de deux principaux paramètres : l'huile essentielle et sa composition chimique d'une part, et le microorganisme (type, structure...) d'autre part [21].

#### **1.3.8.2.1 Activité liée à la composition chimique**

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Toutefois, les composés minoritaires pourraient agir de manière synergique [22].

De nombreuses études ont mis en évidence une activité antimicrobienne qualitativement similaire entre les huiles essentielles et leurs composés chimiques testés isolément. Cependant il existe des différences quantitatives. En effet, il a été prouvé que l'effet antimicrobien des huiles essentielles est supérieur à celui de ses composés majoritaires testés séparément.

L'association des principaux composés actifs agirait de façon synergique en potentialisant l'action antimicrobienne de l'huile essentielle [23].

Les composés chimiques connus pour leur efficacité antimicrobienne et leur large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools, ( $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les carbures [18].

Les phénols, dont le thymol et l'eugénol, sont responsables de l'activité bactéricide des huiles essentielles qui en contiennent [19].

Ils produisent des dégâts irréversibles au niveau de la membrane [18].

Cependant, il est à signaler que les phénols seuls ne sont pas responsables de l'intégralité de l'activité des huiles essentielles; les autres composés chimiques doivent également être pris en compte [21].

Les alcools sont généralement plus connus pour leur activité létale que bactériostatique sur les cellules végétatives, en dénaturant les protéines [22].

Les aldéhydes, fortement électronégatif à double liaison, deviennent de puissants agents antimicrobiens en réagissant avec les composés nitrés vitaux (protéines et acides nucléiques) des bactéries [17].

#### **1.3.8.2.2 Activité liée au microorganisme**

Une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou encore n'avoir aucun effet. Ceci peut être lié au type de microorganisme (à Gram positif ou à Gram négatif), à sa forme planctonique ou en biofilm, à son métabolisme et à sa résistance.

En effet, les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif [22].

Par ailleurs, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles diffère selon que la bactérie croît en forme planctonique ou au sein d'un biofilm bactérien [21].

La résistance bactérienne aux huiles essentielles, comme pour tout agent antimicrobien, semble être liée à la formation du biofilm. En effet, un isolat clinique récent peut montrer une résistance augmentée, pouvant provenir des interactions avec les cellules de l'hôte, tandis que les microorganismes évoluant sous forme planctonique sont plus susceptibles [22].

#### **1.4. Marjolaine (*origanum majorana.L*)**

##### **1.4.1. Définition**

La Marjolaine ou Origan des jardins (*Origanum majorana.L*) est une plante annuelle de la famille des Lamiacées, cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles aromatiques. C'est une espèce très proche de l'Origan commun (*Origanum vulgare*). Elle est parfois appelée Marjolaine des jardins. Autres noms communs : marjolaine officinale, marjolaine à coquilles [23].

La marjolaine est, relativement proche du thym, tant par son odeur que par sa composition chimique. Elle appartient à la famille des Labiacées. D'environ 60 cm de haut, la marjolaine se caractérise par des petites fleurs blanches ou mauves, sous forme de calice et des feuilles duveteuses, de forme ovale et de couleur vert gris, poussant par paire.

Sauvage, elle est communément connue sous le nom d'origan, du fait de son étymologie grecque organon signifiant "montagne et joie" ou "aime la montagne". Elle peut également se faire appeler marjolaine à coquilles, de Crète, dictame, thym de berger, thé rouge [24].





**Figure 1.1** : photo de l'*Origanum majorana* [23]

Ses propriétés médicinales : [24]

- Calme les douleurs musculaires, articulaires, crampes, courbatures, et les règles douloureuses.
- Un tranquillisant du système nerveux.
- Nervosité, dépression, anxiété, insomnies et aux migraines.
- Troubles digestifs, spasmes intestinaux, flatulences, ballonnements, diarrhées, nausées et stimule l'appétit
- Régule la tension artérielle.
- Nettoie les voies respiratoires.( En inhalation)
- Un antiseptique efficace contre les aphtes, maux dentaires, la gingivite et autres infections touchant la bouche.
- Apaise les foulures et les douleurs articulaires.
- Soigne les plaies superficielles.
- Problèmes respiratoires.
- Calme les accès de toux
- En cas d'asthénie.

#### **1.4.2. Description de la plante**

La marjolaine (*Origanum majorana*) est une plante annuelle de la famille des lamiacées, cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles aromatiques. C'est une espèce, très proche de l'origan, qui possède des feuilles de 1 à 2 cm de long, opposées, d'un vert grisâtre, de forme ovale entière. Ses fleurs sont petites, blanches ou mauves, disposées en groupes serrés à l'aisselle des feuilles avec deux bractées en forme de cuillère [25].

Cette herbe s'emploie sous forme de feuilles fraîches ou séchées, seule ou en mélange avec d'autres herbes, pour aromatiser de nombreuses préparations culinaires. La marjolaine est connue aussi pour ses propriétés anaphrodisiaques. C'est une plante aromatique très utilisée en cuisine, notamment dans les mets culinaires méditerranéens, son huile essentielle est connue pour sa propriété antiseptique [26].

### **1.4.3. Identification**

Plante d'environ 30 cm de haut, ligneuse à la base, pubescente. Racine pivotante tortueuse plus ou moins ramifiée. Tige à section quadrangulaire, dressée, ramifiée, de coloration rougeâtre. Feuilles simples, opposées, pétiolées, ovales, allongées, à bords lisses, mesurant environ 2 cm de long sur 1 cm de large, recouvertes d'un duvet blanchâtre. Inflorescences en épis globuleux, axillaires et terminaux, groupés par 3. Fleurs zygomorphes, petites, blanches ou rosées, enveloppées à la base par de larges bractées en forme de coquille. Calice gamosépale, bilabié, à 5 pièces. Corolle gamopétale, à 5 pièces, formant une lèvre supérieure échancrée et une lèvre inférieure trilobée. Etamines au nombre de 4, dont 2 plus longues, présentant des anthères rougeâtres à lobes écartés. Ovaire formé de 2 carpelles biovulés surmontés d'un style à stigmate bifide [27].

### **1.4.4. Huile essentielle de marjolaine**

#### **1.4.4.1. Propriétés.**

L'huile essentielle de marjolaine est particulièrement riche en terpinéol. Elle a un aspect liquide, limpide, une couleur jaune pâle à foncé et une odeur douce, fine, chaude et délicate. Elle est obtenue par distillation de ses sommités fleuries et de ses feuilles. Elle est considérée comme un puissant antispasmodique stomachique, qui calme les spasmes et plus particulièrement ceux de l'estomac et du colon, son action laxative et digestive contribue au bien être digestif et intestinal [28].

Elle possède aussi des effets notables sur le système psycho-sensoriel. Elle est utilisée pour atténuer le rôle du système sympathique et pour favoriser l'action relaxante et reposante du système parasympathique [29].

Vu sa propriété antitoxique, elle sera utilisée en applications locales sur les boutons pour inactiver le venin des insectes, inoculé par piqûre [28].

La composition de l'huile essentielle de marjolaine est exprimée en pourcentage de divers composés des familles des monoterpénols, des monoterpènes, des sesquiterpènes et des esters terpéniques: -Monoterpénols: terpinén-4-ol (22.85%), (E)-hydrate de sabinène (15.94%), (Z)-paramenth-2-ène-1-ol (1.98%), (E)-para-menth-2-ène-1-ol (1.25%), alpha-terpinéol (4.88%), (Z)-hydrate de sabinène (4.40%) -Monoterpènes : gamma-terpinène (12.60%), sabinène

(7.65%), alpha-terpinène (7.73%), bêta-phellandrène (1.90%), terpinolène (2.92%), bêta-pinène (0.43%), alpha-pinène (0.77%), para-cymène (1.57%), alpha-thujène (0.77%), limonène (1.76%), alphaphellandrène (0.56%) -Sesquiterpenes : bêta-caryophyllène (2.49%), bicyclogermacrène (1.22%) -Esters terpéniques : acétate de linalyle (1.70%).[30]

#### **1.4.4.2. Activité antioxydante de l'extrait de marjolaine.**

Les extraits de marjolaine contiennent un taux considérable de phénols et d'autres composés aromatiques comme l'alpha-terpinène, le terpinolène et le thymol ou des acides hydroxycinnamiques et des flavonoïdes. Les acides rosmarinique (**Fig.2**) et caffeique ont été aussi détectés [31].

Il été établi que l'extrait de marjolaine peut avoir une activité antioxydante dans les lipides. En effet, l'extrait méthanolique de la marjolaine possède une activité antioxydante qui peut dépasser celle du BHT et du BHA à une faible concentration de 200 ppm dans le saindoux à 75°C. Il peut avoir une activité synergique avec d'autres molécules comme l'acide citrique [31].

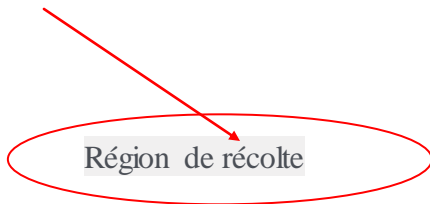
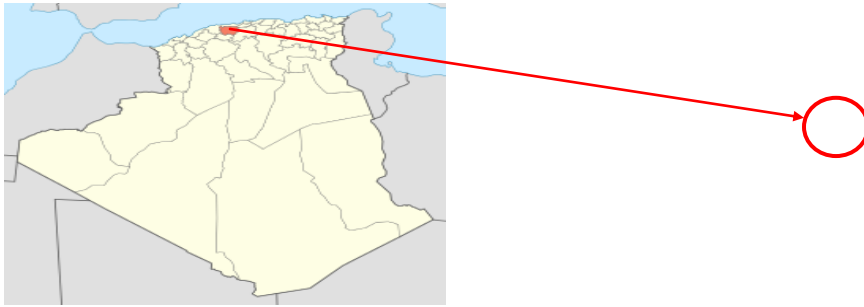
Les extraits de marjolaine sont aussi utilisés comme additives pour prolonger la vie des produits de poisson durant la congélation et le stockage [32].

Les composés volatils de marjolaine (*Origanum majorana L.*) dans l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation et les extraits obtenus par extraction avec de l'alcool éthylique et l'extraction par fluide supercritique (SFE) ont été étudiés. En effet, les extraits éthanolique et supercritique ont une composition similaire, bien que le taux de terpinèn-4-ol dans l'extrait au SFE a été presque deux fois plus élevé que celui de l'extrait à l'éthanol [30].

Une quantité de linalol de 1,1% a été détecté dans l'extrait au SFE, de 6% dans l'extrait de solvant et de 12% dans l'huile essentielle [30].

Dans d'autres études, les propriétés antioxydantes des extraits de marjolaine venant de l'égypte, (*Origanum majorana L.*) obtenus avec de l'éthanol, de l'hexane, et l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique ont été déterminées par la méthode de Rancimat. L'extrait au CO<sub>2</sub> supercritique a été le plus efficace et le plus riche en carnosol (**Fig.2**) [30].





**Figure 2.1:** Carte géographique de région de récolte

La période de récolte s'étale du mois de février, mars et avril 2017, l'extraction de l'huile essentielle est faite à partir des parties aérienne : les tiges et les feuilles .



**Figure 2.2 :** La marjolaine fraîche et sèche

## **2.2. Extraction de l'HE de marjolaine par hydrodistillation :**

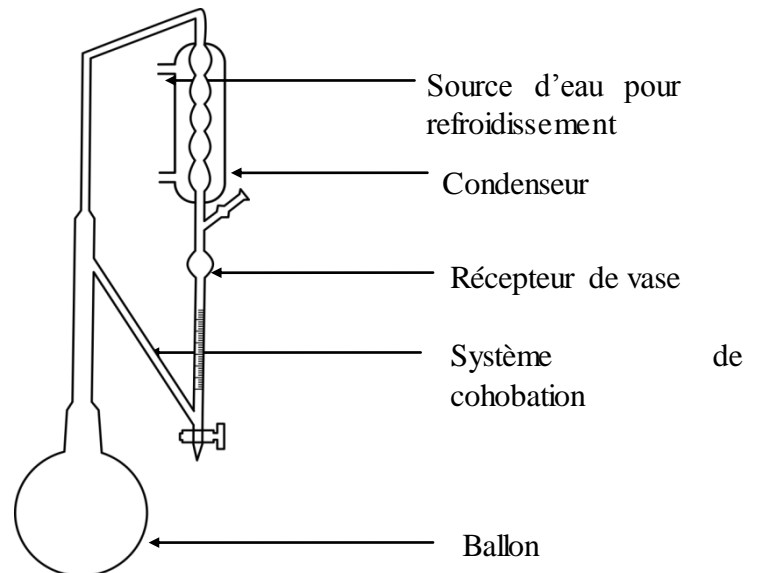
### **Mode opératoire**

Le matériel végétal séché est soumis à une hydro distillation au moyen d'un appareil d'extraction de type Clevenger (figure 2.3), où 50 g de matière végétale sont introduites avec 400 ml dans un Ballon d'un litre. il est placé sur un chauffage à gaz naturel, et surmonté d'un "chapiteau" qui le relie au condenseur. Ce dernier est formé d'un serpentín de cuivre plongé

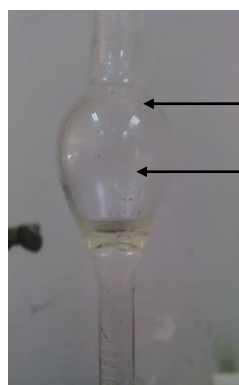
dans un bac de refroidissement où circule de l'eau fraîche en permanence, l'ensemble est porté à ébullition après 15 min, les vapeurs chargées d'huile essentielle traversant le tube de cuivre (condenseur) se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, en fin de décantation on obtient deux phase (huile essentielle + hydrolat) , l'eau et l'huile se séparent par différence de densité et de couleur .On la sépare de celui-ci par décantation (figure 2.4).

❖ **Conditions opératoires de l'extraction des HE par HD**

- Quantité des grains broyés(g) 50
- Quantité d'eau distillée (ml) 400
- Temps d'hydro-distillation (h) variable 2 à 4h



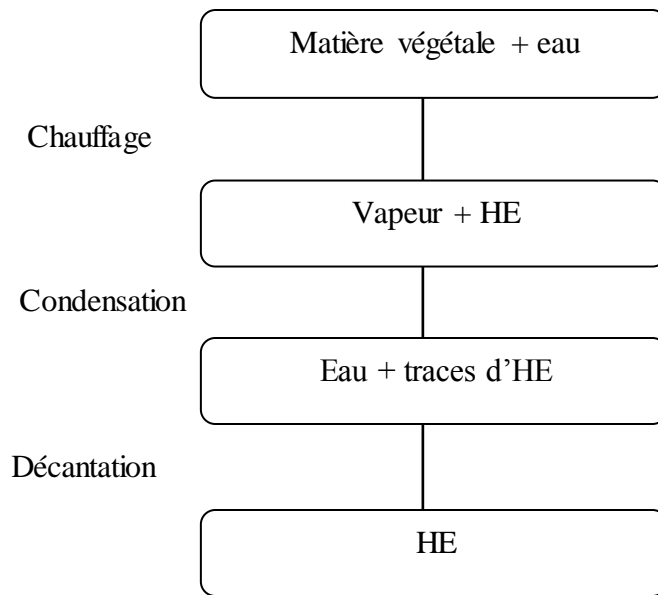
**Figure 2.3 :** Appareil de Clevenger pour l'hydro distillation



Phase organique (Huile essentielle)  
Phase aqueuse (hydrolat)

**Figure 2.4 :** La formation de deux phases

❖ **Le plan d'extraction d'HE est illustré comme suit, (figure.2.5)**



**Figure 2.5 :** Les étapes d'extraction d'HE

### **2.3. Conservation d'huile essentielle obtenue :**

L'huile essentielle extraite est conservée à une température de 4°C, dans des microtube, couverte avec du papier aluminium, fermés hermétiquement pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de températures qui sont les principaux agents de dégradation. Une huile altérée perd son activité biologique.

### **2.4. Rendement en huile essentielle :**

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale sèche utilisée. [34,35]

Le rendement en huiles essentielles est exprimé en pourcentage et donc par la relation suivante :

$$\text{RHE}(\%) = (\text{MHE} / \text{MS}) \cdot 100 \quad (2.1)$$

Où :

RHE : Rendement en HE ( %).

MHE : Masse d'HE récupérée exprimé en (g).

MS : La quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en (g).

## **2.5. Cinétique d'extraction de l'huile essentielle :**

Pour étudier la cinétique d'extraction de l'huile essentielle de marjolaine à l'état sec. Nous avons récupéré des quantités de l'huile essentielle correspondantes à des intervalles de temps.

De 30 mn qui s'étalent de 0 à 120 mn. Les quantités des huiles essentielles obtenues vont être exploitées dans le but de calculer le rendement à chaque intervalle de temps.

## **2.6. Caractérisation de l'huile essentielle :**

Les huiles essentielles, doivent répondre à des caractéristiques analytiques qui sont établies par des commissions Nationales et internationales d'experts.

Selon la norme **AFNOR**, chaque huile essentielle est caractérisée par ces propriétés organoleptiques, et physico-chimiques pour connaître la qualité de l'huile essentielle de la marjolaine étudiée. [37]

### **2.6.1. Caractères organoleptiques :**

Chaque huile essentielle est caractérisée par ses propres caractères organoleptiques tels que : l'odeur, l'aspect et la couleur qui sont décrites par la norme **AFNOR**.

#### **❖ l'odeur**

L'odeur est un sens chimique très sensible et des l'habilité des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parvient à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'à dix millionième de grammes par titre d'air. [38]

#### **❖ La couleur**

La coloration d'une huile dépend des produits qui la constituent. [38]

#### **❖ l'aspect physique**

L'aspect d'une essence végétale change selon les produits qui la constituent, cette essence peut apparaître sous forme solide, liquide, ou semi-solide. [38]

### **2.6.2. Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles étudiées**

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de norme de l'Association française de Normalisation (AFNOR). [39]



### 2.6.2.1. Les propriétés physiques :

#### ❖ Mesure de pH par un pH mètre

##### Principe

pH est l'abréviation du potentiel d'hydrogène, mesure l'activité chimique des ions hydrogènes ( $H^+$ ) (Appelés aussi couramment protons) en solution. Plus couramment, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre : elle est acide si son pH est inférieur à 7, neutre s'il est égal à 7, basique s'il est supérieur à 7. [40]

##### Mode opératoire

Avant de commencer, on étalonne le pH mètre puis on prends une quantité de la marjolaine. et on la met dans un verre d'eau distillé stérile pendant une heure ensuite on lit la valeur de ce pH



Figure 2.6 : Le pH mètre

#### ❖ pH par un papier pH

##### Principe

Le papier pH est une méthode fréquemment employée en raison de sa simplicité d'utilisation et de son coût abordable. Il se présente sous la forme de bandelettes de papier imprégnées de réactifs qui changent de couleur selon le pH de la solution. [41]

##### Mode opératoire

On met quelques gouttes de l'huile de la marjolaine sur un papier imbibé d'un indicateur universel et on attend les résultats.

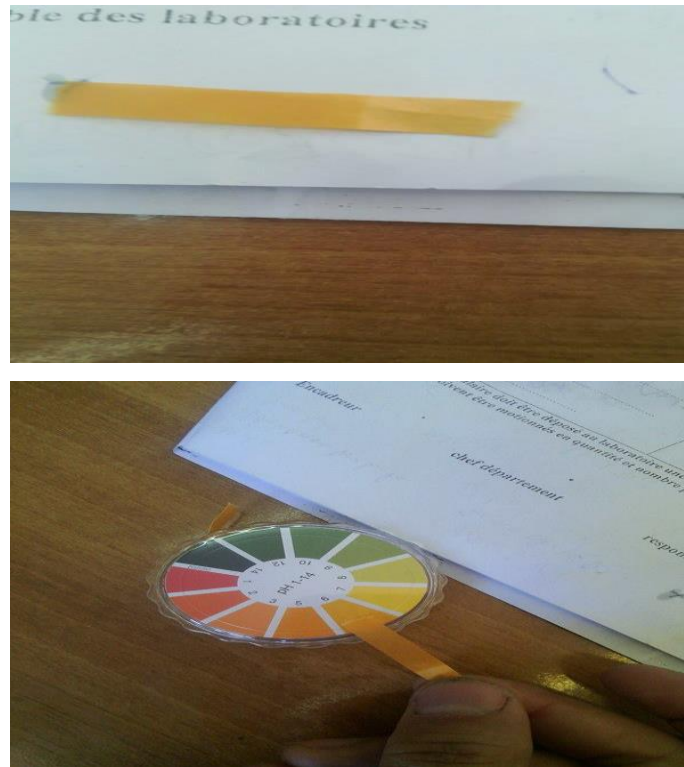


Figure 2.7. Les résultats du pH sur un papier

❖ **La densité relative à 20° C ( $D_{20}$ )**

**Principe**

La densité relative de l'huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un même volume d'eau distillée à 20°C

**Mode opératoire**

A l'aide d'une micropipette prélever un volume de 1ml d'huile essentielle étudié et peser ce volume par une balance analytique. la même chose est faite par l'eau. [38]

La densité relative  $D_{20}$  donnée par la formule suivante :

$$D_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad (2.2)$$

Où :

$m_2$  : La masse en g de tube rempli d'huile essentielle

$m_0$  : la masse en g de tube vide

$m_1$  : la masse en g de tube rempli d'eau

❖ **L'indice de réfraction ( $IR$ )**

## Principe

L'indice de réfraction relie le sinus de l'angle d'incidence à celui de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée. Passant de l'air dans l'HE maintenue à une température . La valeur affichée à celle de l'indice de réfraction, noté ***IR***

L'indice de réfraction d'une matière, est un caractère qu'a cette matière, à ralentir et à dévier la lumière. Plus la lumière est ralentie. plus la matière un indice de réfraction élevé.

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un réfractomètre d'ABBE. [42]

## Mode opératoire

Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à 20°C. Ouvrir le prisme secondaire et déposer 2 ou 3 gouttes de l'échantillon liquide sur la partie centrale du prisme principale. Fermer ensuite doucement le prisme secondaire. L'échantillon s'étale entre le prisme principal et le prisme secondaire en un film mince. Atteindre que la température soit stable et effectuer la mesure. [38]

Les indices de réfraction sont mesurés à l'aide d'un réfractomètre à la température de chambre puis ramenés à 20°C par la formule :

$$I_{20} = I_t + 0.00045(t - 20^\circ\text{C}) \quad (2.3)$$

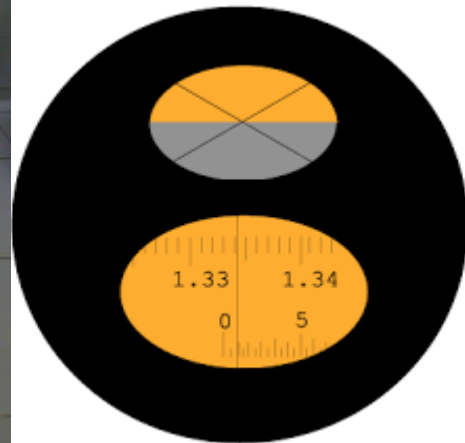
Où :

$I_{20}$  : Indice à 20°C

$I_t$  : Indice à la température de chambre :

T : Température de mesure.

Notons que pour un même échantillon, la mesure de la réfractométrie est effectuée trois fois et on prend la moyenne des 3 valeurs.



**Figure 2.8 : Réfractomètre**

### 2.6.2.2. Propriétés chimiques

#### ❖ l'indice d'acide

##### Principe

L'indice d'acide d'une huile est défini comme étant le nombre de milligrammes de potassium(KOH) nécessaire pour la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle [43].

##### Mode opératoire

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile. A 0,2 g d'huile dissoute dans 10 ml d'hexane, on ajoute 2 à 3 gouttes de phénophtaléine. La solution ainsi obtenue est tirée par une solution de KOH (0,01N) dans l'éthanol jusqu'à l'apparition d'une coloration rose. La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps, l'indice d'acide permet donc de juger de leur état de détérioration. [44]

L'indice d'acide (IA) est exprimé par la formule :

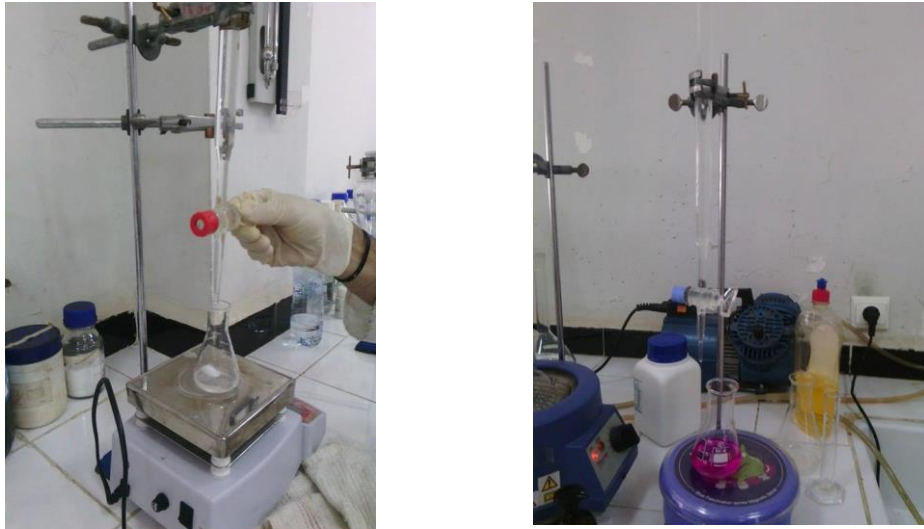
$$I_A = 56.11V / m \quad (2.4)$$

Où :

V : Le volume, en ml de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé pour le titrage.

m : La masse en g de la prise d'essai (exprimer le résultat à une décimale près)

56.11g=Masse moléculaire relative de KOH.



**figure 2.9** : Dispositif de titrage pour définir l'indice d'acide

#### ❖ Indice d'ester

#### Principe

Cette détermination consiste en l'hydrolyse par chauffage des esters présents dans l'HE, dans des conditions définies. En présence d'une solution éthanoïque titrée de KOH, et au dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution titrée d'acide chlorhydrique (HCl).

#### Remarque

Il est important de maintenir les réactifs aux températures spécifiées de 20°C, notamment la solution éthanoïque de KOH, étant donné que le volume des échantillons varie considérablement en fonction de la température.

#### Mode opératoire

2g d'HE sont pesés dans un ballon, puis 25 ml de KOH (0.5N) sont ajoutés ainsi que quelque bille en verre. Le ballon est adapté au réfrigérant et l'ensemble est porté à ébullition pendant 60 min. A compter de l'apparition de la première goutte. Après refroidissement, 20 ml d'eau et 5 gouttes phénolphtaléine sont ajoutées au mélange.

La solution est finalement titrée avec HCl en solution aqueuse 0.5N sous agitation continue, Au virage de la coloration (solution incolore), le volume  $v_1$  versé est soigneusement, 20 ml de KOH (0.5N) sont bouillis pendant une heure dans un ballon.

Après refroidissement, 20 ml d'eau distillé et 4 à 5 gouttes de phénolphtaléine sont ajoutées. La solution est ensuite titrée avec HCl (0.5N), au virage de la coloration (solution incolore). Le volume  $v_0$  versé est noté. [38]

L'indice d'ester,  $I_E$  est donné par l'équation ci-après :

$$I_E = 28.5 / m (V_0 - V_1) - I_A \quad (2.5)$$

Où :

$V_0$  : volume en ml de HCl 0.5N utilisé pour l'essai à blanc.

$V_1$  : volume en ml de HCl 0.5N utilisé pour la prise d'essai.

$m$  : Masse en g d'huile essentielle.

$I_A$  : valeur de l'indice d'acide

L'indice d'ester est exprimé avec deux chiffres décimaux significatifs s'il est inférieur à 100 et avec trois chiffres décimaux significatifs s'il est supérieur.



figure 2.10 : Dispositif de titrage pour définir l'indice d'ester

## 2.7. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle

### ❖ Analyse chromatographique

#### 2.7.1. Préparation des échantillons pour essai

Une quantité de 0.2 $\mu$ l d'HE est prélevée et injectée dans l'appareillage pour déclencher les procédures d'analyse. (délusion hexane)

### 2.7.2 Conditions opératoires de la GC/ MS

Les analyses chromatographiques des HE ont été effectuées sur un CPG type Hp(Agiles technologies) 6800 plus couplé avec un SM (Agilent technologies) MSD 5973

La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire Hp-5 MS largeurs 30 m et diamètre 0,32 mm, épaisseur film 0,25  $\mu\text{m}$ . La température de la colonne est programmée de 50 à 250  $^{\circ}\text{C}$  à raison de 4  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit GV est fixé à 0,5  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98 et piloté par un logiciel « Hp ChemStation ». Ceci permettra l'identification des constituants aromatiques de l'HE.



**Figure 2.11** chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (CGMS)

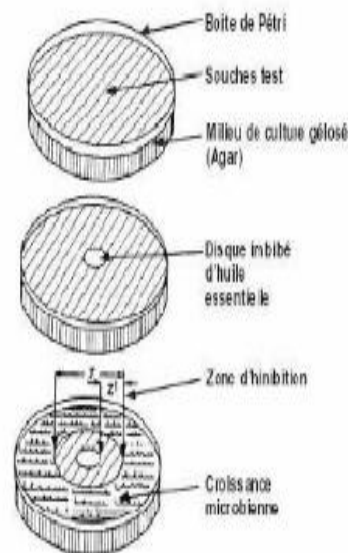
## 2.8. L'activité biologique

### 2.8.1. Etudes de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielle de la marjolaine a été faite au niveau de laboratoire d'analyse médical de Mr. Zibouche à Ain Defla, vis-à-vis des souches obtenues d'un l'hôpital d'Alger.

Pour évaluer l'activité antibactérienne des HEs, nous avons adopté la méthodes de diffusion sur milieu gélose en utilisant des disques stériles en cellulose : appelée aromatoگرامme. Cette technique est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par des extraits aromatique.[45]

Le principe des méthodes repose sur la diffusion du composé antibactérien en milieu solide dans une boîte de pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le micro-organisme cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible. Très sensible, extrêmement ou résistante.



**Figure 2.12** Schéma simplifié de principe de la méthode de l'aromatogramme

### 2.8.1.1. Préparation de l'inoculum

#### ✓ Préparation de pré-culture

Les tests antibactériens doivent être réalisés des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide (bouillon nutritif). Après incubation pendant 24 heures à 37°C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive (GN) puis, incubées à 37°C pendant 18 heures.

### 2.8.1.2. Préparation des disques

Les disques sont préparées à partir du papier whatman (ou autre type de papier buvard) avec un diamètre de 6 mm, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave 15 minutes à 120°C. puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).



### **2.8. 1.3. Préparation de milieu de culture**

Le milieu de culture est Muller-Hilton. Qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

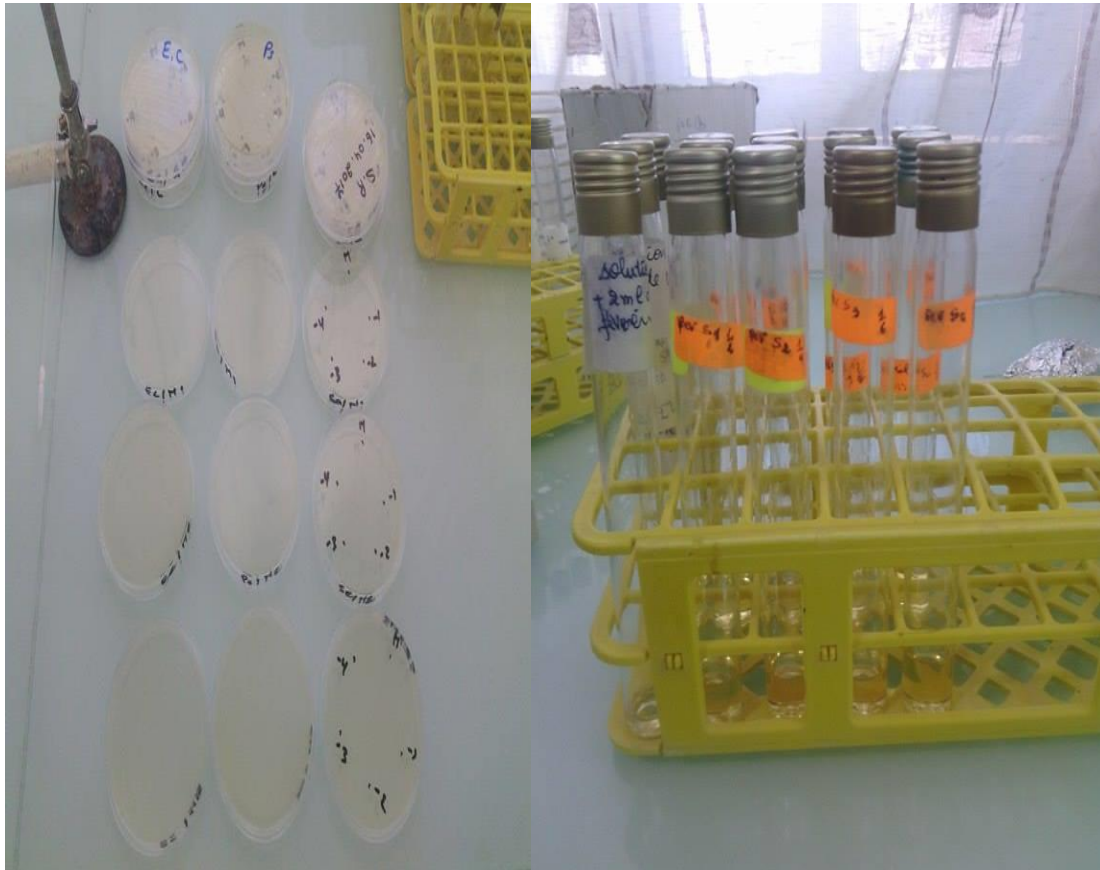
On fait fondre le milieu (M-H) dans une autoclave à 120° pendant 15 min et laisser refroidir à 45°C, en suite en verre aseptiquement le milieu dans des boites de pétri (diamètres 90mm) à raison de 15 ml par boîte (4 mm d'épaisseur de gélose). On laisse refroidir et solidifier sur pailleasse avant l'emploi.

#### **Protocole expérimental (aromatogramme des souches)**

##### **A. L'ensemencement :**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (éviter la contamination du manipulateur et de la pailleasse) ;
- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum ;
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée. Sèche, de haut en bas, en stries serrés ;
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire Pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur le périphérique de la gélose ;

Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boites de pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois. [46]



**Figure 2.13** schémas simplifié du principe de la méthode de l'organigramme

### **B. dépôt de disque**

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques sur une boîte de 90 mm.

A l'aide d'une pince stérile. On prélève à chaque fois un disque stérile, et on l'imbibes avec l'huile essentielle en mettant seulement en contact le bout du disque avec l'huile essentielle, celle-ci va être absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque. On les dépose sur la surface de la gélose pour diffuser sur les boîtes de pétri pendant 30 min, puis on incube à 37°C pendant 24 heures.



**Figure 2.14** : dépôt de disque

**Remarque :**

- Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose.
- Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte.

**C. La lecture**

La lecture se fait par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition, ou des halos clairs tout autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par les diamètres de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HEs.

L'inhibition est notée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm. [47]

**2.8.1.4. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle**

Les zones d'inhibition obtenues ne sont pas représentatives dans le cas des huiles qui ne diffusent pas bien dans le milieu de culture, malgré leur dissolution dans un solvant organique, et par conséquent le calcul des diamètres d'inhibition seront erronés.

Pour cela, la recherche de l'activité antibactérienne avec cette méthode est insuffisante, il faut cependant utiliser la méthode "de détermination de la concentration minimale inhibitrice", pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles.

#### ❖ **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Nous avons déterminé la CMI pour l'HE de la marjolaine qui présente une activité antibactérienne importante vis-à-vis de Staphylocoques aureus, Escherichia coli, et Klebsiella pneumoniae.

La CMI est définie comme étant la plus concentration en HE capable d'induire une réduction de la Croissance microbienne de 90% ; donc ne laisse suivre que 10% de la population (aucune croissance n'est visible à l'œil nu).

#### **Préparation de la gamme de dilutions**

Des dilutions successives au demi ont permis de préparer une gamme de dilution allant de 0.4g d'HE avec 4 ml de tween 80 (voir tableau).

**Tableau 2.2 :** Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI

<b>rapport de dilution (HE/tween 80)</b>	M	1/2	1/4	1/6	1/8
<b>Tween80/ml</b>	4	2	2	2	2

#### **2.8.2. L'activité antioxydante**

Actuellement une grande diversité des méthodes analytiques est disponible pour la détermination de la capacité antioxydant. Dans notre étude, l'activité antioxydante des huiles essentielles est évaluée par le test de la réduction du radical libre du DPPH.



**Figure 2.15 :** Préparation des dilution

### 2.8.2.1. Test au DPPH

#### Principe

Le 2,2-diphényl-2-picryl-hydroxyle est un radical libre stable violet en solution. Il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm.

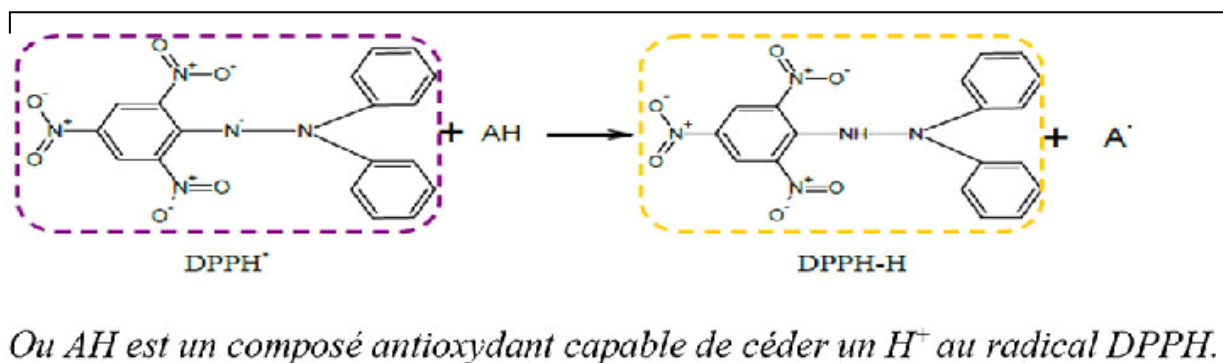
Le test au DPPH permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la  $CI_{50}$  des substances antioxydants contenues dans un extrait. Ce radical libre possède une coloration violette foncée. Lorsqu'il est réduit par un antioxydant (composé à propriété anti radicalaire) en Diphényle picryl hydrazine. Sa coloration devient jaune pâle. Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoration de la forme libre en solution dépend de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance anti radicalaire.

On peut résumer la réaction sous de l'équation :



Où :

(AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picrylhydrazine (jaune)



**Figure 2.16 :** Forme libre et réduite du DPP

### Préparation de la solution de DPPH

Le DPPH 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ) est polaire dans du méthanol. Trois milligrammes de DPPH sont pesés à l'aide d'une balance de précision et solubilisés ensuite dans 100 ml de méthanol ou éthanol) pour avoir une concentration finale de 0.800%.

### Mode opératoire

Dans des tubes secs et stériles, 1 ml des solutions éthanoliques de l'huile essentielle testées à différentes concentrations (1000, 800, 600, 400, 200, 100  $\mu$ /ml) sont mélangées avec 1 ml d'une solution éthanolique de DPPH (0.800%).

Après agitation au vortex, les tubes sont placés à l'obscurité (incubation). A température ambiante pendant 30 min, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant.

Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. En outre un contrôle négatif constitué de 1 ml de la solution éthanolique de DPPH 0.800% et de 1 ml de méthanol doit être réalisé. La densité optique (DO) est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (figure 2.18). On détermine les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour HE. (%I,  $IC_{50}$ ). Tous les essais ont été effectués en triple. [58]

Les résultats peuvent être exprimés en capacités anti-radicalaire (AA%) ou par l'inhibition des radicaux libres en pourcentage (1%) en utilisant la formule suivante :



**Figure 2.17 :** Spectrophotomètre UV-Visible

$$AA(\%)=100-\{[(\text{Abs échantillon}-\text{Abs blanc})\cdot 100] / \text{Abs control}\} \quad (2.6)$$

Ou encore :

$$I(\%)= \{(\text{Abs control}-\text{Abs échantillon})/\text{Abs contrôle}\} \quad (2.7)$$

Soit :

AA : Activité antioxydant.

I(%) : pourcentage d'inhibition en %.

Abs échantillon : Absorbance du test effectué.

Abs contrôle : Absorbance du contrôle négatif (solution témoin, à blanc).

### **Calcul des IC<sub>50</sub>**

Ic<sub>50</sub> ou concentration inhibitrice de 50% (aussi appelée EC<sub>50</sub> pour Efficient concentration 50), c'est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH°. Les IC<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés : pourcentage d'inhibition en fonction de différente concentration des fractions testées. [49]

### 3.1. Rendement en huiles essentielles :

Les résultats de calcul du rendement obtenus lors de l'extraction de l'huile essentielle de la matière sèche (tiges et feuilles) de l'*origanum majorana* L. par hydro distillation, au bout de trois mois de récolte (Février, Mars et Avril) sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 3.1** : Le rendement d'HE de l'*origanum majorana* L.

Le mois	Février	Mars	Avril	[48]
Le rendement %	0.65	2.1	2.25	0.665

C'est résultats montre clairement que la marjolaine produise une quantité d'HE remarquable si on compare leur rendement par rapport à la littérature, et surtout dans le mois d'Avril.

Cette différence de rendement a été décrite par la bibliographie, est due à l'influence des facteurs environnementaux, comme la température, l'humidité, l'altitude et la nature du sol et d'autres facteurs tels que le cycle végétatif, la période de récolte, les parasites, les virus et les mauvaises herbes.

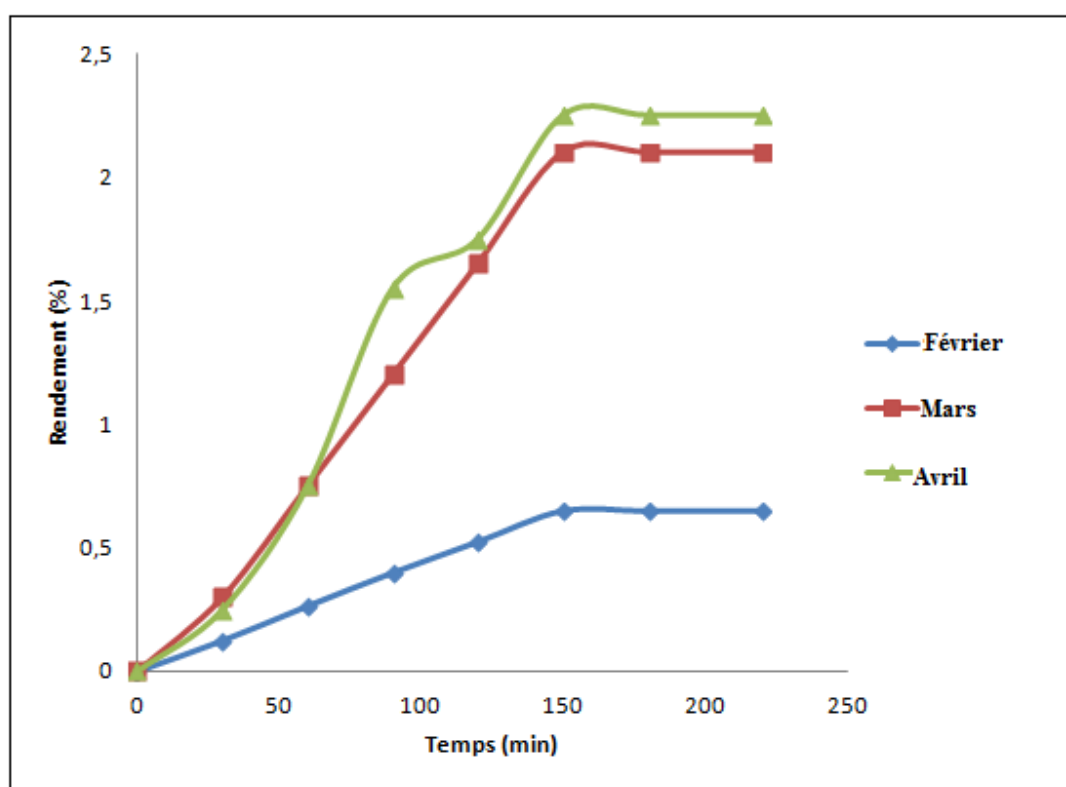
### 3.2. Influence de temps sur l'extraction de l'huile essentielle

L'évolution du rendement en fonction du temps est donnée dans le (**tableau 3.2**) et représentée par la (**Figure 3.1**).

**Tableau 3.2.** : Influence de temps sur l'extraction de l'huile de l'*origanum majorana* L.



Temps (min)	0	30	60	90	120	150	180	220
RHE% (février)	0	0.125	0.265	0.4	0.525	0.65	0.65	0.65
RHE% (mars)	0	0.3	0.75	1.2	1.65	2.1	2.1	2.1
RHE % (avril)	0	0.25	0.75	1.55	1.75	2.25	2.25	2.25



**Figure 3.1** Influence de temps sur l'extraction d'huile de *Origanum majorana* L.

**Pour le mois de Février :**

- Nous observons une augmentation régulière du rendement entre 30 et 150 minutes, pour arriver à un rendement de 0.65 %
- De 150 à 220 nous enregistrons un rendement stationnaire.

#### **Pour le mois de Mars :**

- Aussi nous observons une augmentation régulière du rendement entre 30 et 150 minute mais le rendement est plus élevé 2.1 %
- De 150 à 220 nous observons aussi un rendement stationnaire.

#### **Pour le mois d'Avril :**

- Il y'a une augmentation non régulière du rendement entre 30 et 150 minute avec un rendement de 2.25 %, après on observe un rendement stationnaire jusqu'à 220 minute.
- L'accroissement du rendement de mois d'avril est le plus important que les autres.

### **3.3. Caractérisation de l'huile essentielle**

La caractérisation (propriétés physico-chimique, organoleptique) constitue un moyen de contrôle de notre l'HE. Ces essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des travaux déjà faits.

#### **3.3.1. Propriétés organoleptique**

Les caractéristiques organoleptiques des HEs de la plante sèche de l'*origanum majorana* L sont présentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 3.3 :** Les caractéristiques organoleptiques d'HE de la marjolaine.

Caractéristique organoleptique	Résultats trouvés	[49]
Aspect physique	Liquide limpide	Liquide limpide
Couleur	Jaune claire	jaune pâle à foncé
Odeur	Douce	Douce, fine, chaude et délicate.

L'huile essentielle de plante sèche de la marjolaine à un aspect liquide limpide ainsi qu'une odeur caractéristique et une couleur jaune claire.



**Figure 3.2** : HE de la marjolaine

### 3.3.2. Propriétés physico-chimiques :

Les résultats de la détermination des propriétés physico-chimiques des essences obtenues par hydrodistillation sont notés dans le (Tableau 3.4):

**Tableau 3.4.** : Caractéristiques physico-chimiques de l'HE de la marjolaine

<b>Caractéristiques physico-chimiques</b>	<b>Février</b>	<b>Mars</b>	<b>Avril</b>
pH (extrait aqueux de la plante)	6.36	6.14	6.16
pH(HE)	6	6	6
La densité	1.0026	1.049	1.050
L'indice de réfraction	1.4695	1.470	1.4635
L'indice d'acide	0.030	0.033	0.033
L'indice d'ester	56.97	56.52	56.65

### **3.3.2.1/Discussion :**

- **pH :**

Le pH indique que notre huile essentielle est presque neutre,. Cette conformité est dus a la pureté de notre l'huile (bien séparé de l'eau).

Le pH d'extrait aqueux de la plante est proche du pH de l'HE, ce qui montre que l'HE de *l'origanum majorana* L. influe sur le pH de ce dernier.

- **La densité :**

C'est un critère de pureté, d'après les résultats obtenus, la densité de notre huile essentielle est de 1.0026 pour Février ,1.049 pour Mars et 1.050 pour Aavril, donc elle est plus dense que l'eau.

- **L'indice de réfraction**

L'indice de réfraction de l'HE de l'*origanum majorana* est de 1.4695 pour février, 1.470 pour mars et 1.4635 pour Avril.

Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. [36] .

- **L'indice acide :**

Les résultats de l'indice d'acide obtenus sont respectivement (0.030, 0.033 et 0.033) pour les mois (Février, Mars et Avril).

L'acidité d'une huile essentielle est un critère d'estimation de sa qualité. Un indice acide faible indique que l'huile essentielle est stable et ne provoque pas une oxydation. [50] Donc d'après les résultats de notre travail on peut dire que notre huile est stable.

- **L'indice ester :**

Les valeurs d'indice ester obtenus sont 56.97 pour Février, 56.52 pour Mars et 56.65 pour Avril.

Les valeurs des indices ester indiquent que l'ensemble des huiles contient d'importance quantité d'acide libre.[50]

Donc l'huile essentielle de l'*origanum majorana L* est contient une quantité importance des acides gras.

La détermination des propriétés physico-chimique est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera donc primordial de déterminer le profil chromatographique de l'essence aromatique.

### **3.4. Analyse chromatographique**

#### **3.4.1 Chromatographie gazeuse couplée a spectrométrie de masse (GC/MS)**

Les résultats de l'analyse quantitative et qualitative de l'HE de la marjolaine sont représentés dans le (tableau 3.5) et par la (figure 3.3).

**Tableau 3.5 :** Composition chimique de l'HE de la marjolaine.

Principaux composés en% de l'HE de la marjolaine					
N° Pic	Nom des composés	t <sub>R</sub> (min)	%	[51]	[52]
1	Cyclohexan	3.018	0.15	-	-
2	α-Thujène	6.322	1.73	0.65	-
3	α-pinène	6.507	1.27	0.76	-
4	Sabinène	7.542	<b>5.14</b>	8.02	4.9
5	Myrcène	7.945	1.19	1.79	-
6	α-Phellandrène	8.398	1.71	0.5	-
<b>7</b>	<b>α-Terpinène</b> (4-méthyl-1-(1-méthyléthyl)-1,3-cyclohexadiène)	<b>8.775</b>	<b>8.80</b>	<b>12.72</b>	-
8	p-Cymène	8.941	2.94	0.8	4.3
<b>9</b>	<b>γ-Terpinène</b> (4-méthyl-1-(1-méthyléthyl)-1,4-cyclohexadiène)	<b>9.116</b>	<b>4.78</b>	<b>18.57</b>	-
10	(E)-β-Ocimène	9.575	0.21	-	-
<b>11</b>	<b>6-γ-Terpinène</b> <b>(terpinolène) (1,4-paramenthadiène)</b>	<b>10.049</b>	<b>9.43</b>	<b>4.06</b>	-
12	6-β-Terpinéol	10.201	0.81	-	-
13	Terpinolène	10.82	<b>3.66</b>	-	-

14	6- $\beta$ -Terpinèol	11.145	<b>3.52</b>	-	-
15	Trans-p-menth-2-en-1-ol	11.798	1.20	-	-
16	Cyclohexane-1-ol,4-methyl-1	12.348	0.90	-	-
<b>17</b>	<b>4-terpinéol (4-méthyl-1-(propan-2yl)cyclohex-3-én-1-ol)</b>	<b>13.706</b>	<b>13.94</b>	<b>28.96</b>	<b>47.1</b>
18	(E)-Octadièn-1-ol, 3,7-Dimethyl	13.984	<b>3.28</b>	-	-
19	Cuminaldehyde	14.085	0.64	-	-
20	Linalylacetate	14.366	0.58	-	-
21	1,3-Dioxolane,2,2-Dimethyl-4,5-di-1-propènyl	15.271	0.23	-	-
22	$\gamma$ -Terpinéol	15.656	0.84	-	-
23	2,6-Octadièn-1-ol,3,7-Dimethyl-,Acetate	16.982	0.90		-

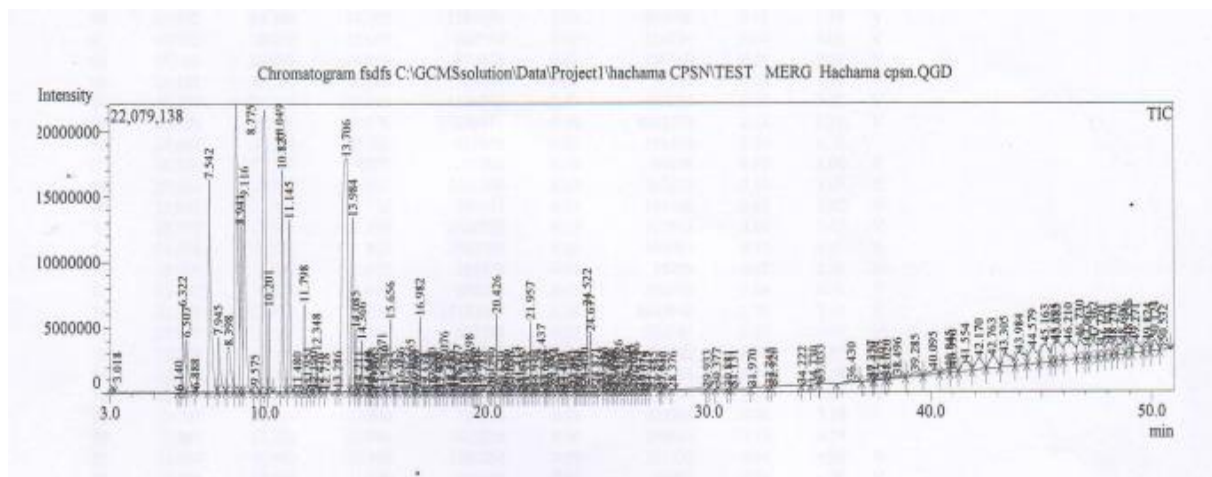
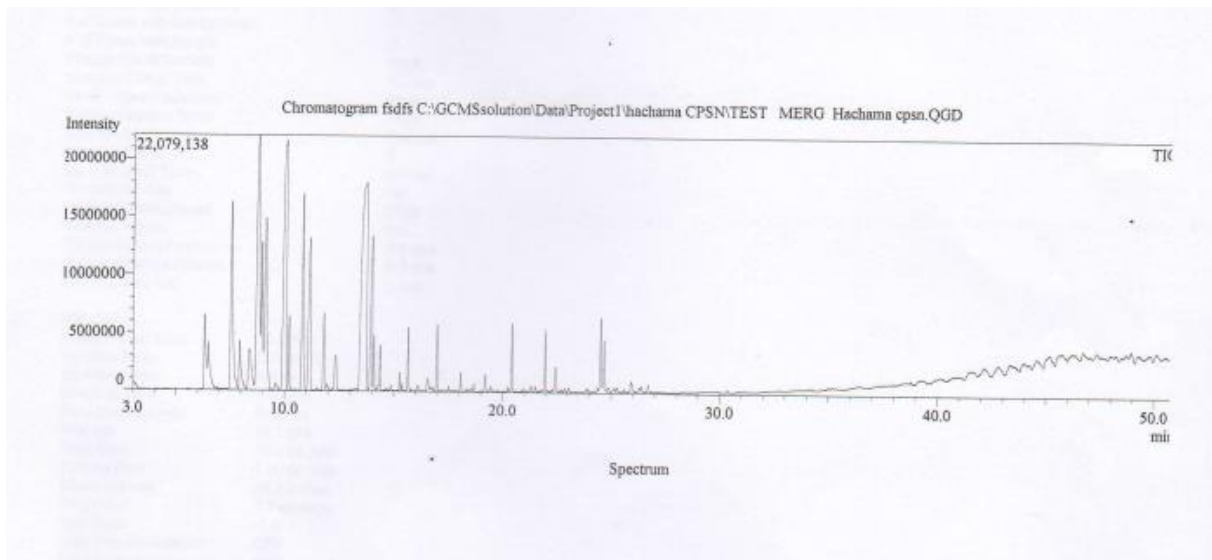
**Tableau 3.5 (suite):** Composition chimique de l'HE de la marjolaine .

<b>Principaux composés en% de l'HE de la marjolaine</b>			
<b>N° Pic</b>	<b>Nom des composés</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>%</b>
24	$\gamma$ -Cadinène	18.070	0.22
25	$\alpha$ -Curcunène	19.198	0.23
26	Spathulénol	20.246	0.90
27	1-(2,4-Dimethylphenyl)-3- (tetrahydrofuryl- 2) propane	21.957	0.80
28	Phénanthrène,7-ethenyl- 1,2,3,4a,4b,5,6,7,8,8a,9 –dodecahydro- 1,1,4b,7- tetraméthyl	24.522	1.19
29	Phénanthrène,7-ethenyl- 1,2,3,4a,4b,5,6,7,8,8a,9 –dodecahydro- 1,1,4b,7- tetraméthyl	24.677	0.77
30	14- $\beta$ –(H)-PREGNA	24.871	0.11

L'analyse quantitative et qualitative de l'HE de la marjolaine avait pour objectif la détermination de la teneur des composants chimiques et leur identité.

Notre huile est très riche de 4-terpinéol (13.94%) ce qui signifie qu'il s'agit du composé majoritaire. Le chromatogramme (**Figure 3.3**) montre aussi l'importance du terpinolène (9.43%),  $\alpha$  –Therpinène (8.80%), Sabinène (5.14%), et  $\gamma$  –Terpinène est présenté avec une teneur appréciable dans l'HE de la marjolaine (4.78%).





**Figure 3.3 :** Chromatogramme de l'huile essentielle de *Origanum majorana L*

### 3.5. Activité antibactérienne

#### 3.5.1. Réactivation des souches

Après repiquage des souches dans un bouillon nutritif, la croissance des bactéries après 24 heures d'incubation à 37 °C se manifeste par l'apparition de trouble.

### 3.5.2. Aromatogramme des souches

L'activité antibactérienne d'HE de la marjolaine sur les souches pathogènes s'est traduite par l'apparition de zone d'inhibition autour des disques, d'un diamètre variable selon la souche.

Les résultats du test de sensibilité bactérienne à HE de la marjolaine sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 3.6.** : Détermination des zones d'inhibition de l'HE de la marjolaine pour les trois mois vis-à-vis les bactéries pathogènes (en cm).


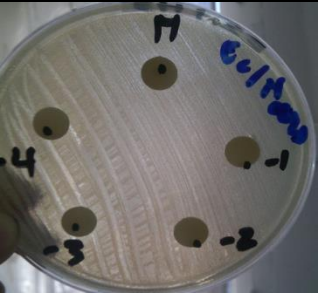




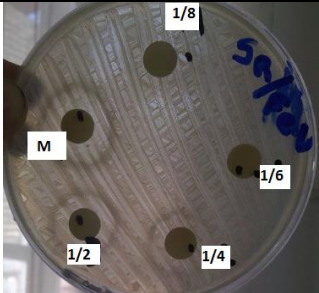
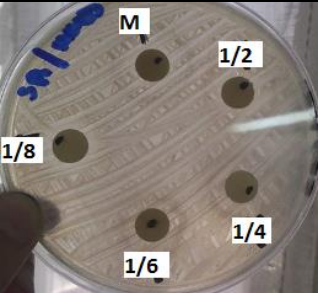
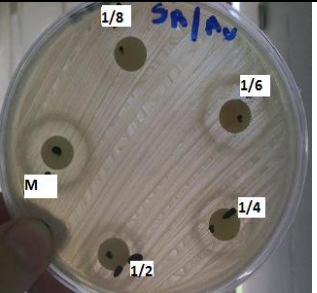
Les mois	Février			Mars			Avri	
Les souches pathogènes	EC	SR	PS	EC	SR	PS	EC	SR
<b>Solution mère (M)</b>	/	1.8	2.1	/	1.8	1.9	/	2
<b>Dilution 1</b>	/	1.8	1.6	/	1.8	1.7	/	1.9
<b>Dilution 2</b>	/	1.6	1.6	/	1.7	1.6	/	1.8
<b>Dilution 3</b>	/	1.5	1.5	/	1.7	1.5	/	1.4
<b>Dilution 4</b>	/	/	1.4	/	/	1.1	/	/

D'après les résultats obtenus nous avons constatés que l'HE de la marjolaine avait exercée une activité inhibitrice vis-à-vis les souches pathogènes, notamment *Staphylococcus aureus* (bactérie gram positive) et *Pseudomonas aeruginosa* (bactérie gram négative), donc ces deux souches sont sensibles envers l'huile de la marjolaine.

L'activité antibactérienne d'HE de la marjolaine sur la souche d'*Escherichia coli* est plus faible, elle présente une certaine résistance.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'une dilution à une autre. La variation de l'activité antimicrobienne des dilutions explique les variations de leurs compositions chimiques.

**Tableau 3.7.** : Les zones d'inhibition de l'HE de la marjolaine vis-à-vis des bactéries pathogènes

	Février	mars	Avril
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<i>Staphylococcus aureus</i>			

### 3.5.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

Les valeurs de CMI étaient variables selon le type d'huile essentielle et la souche visée. Le (Tableau 3.7) illustre les seuils de concentrations minimales inhibitrices.

**Tableau 3.8.** : Concentration minimale inhibitrice d'EH de la marjolaine

	La souche pathogène	Diamètre de la zone d'inhibition (cm)				
		La dilution de l'HE de la marjolaine				
		M	1/2	1/4	1/6	1/8
Février	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	-
mars	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	-	-
Avril	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	-

Février	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
mars	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
Avril	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+

(+) : Croissance bactérienne

(-) : Absence de la croissance bactérienne

On note que la zone inhibitrice exprimée par son diamètre est matérialisée par une auréole claire autour du disque, alors que partout ailleurs, le développement des germes est visible

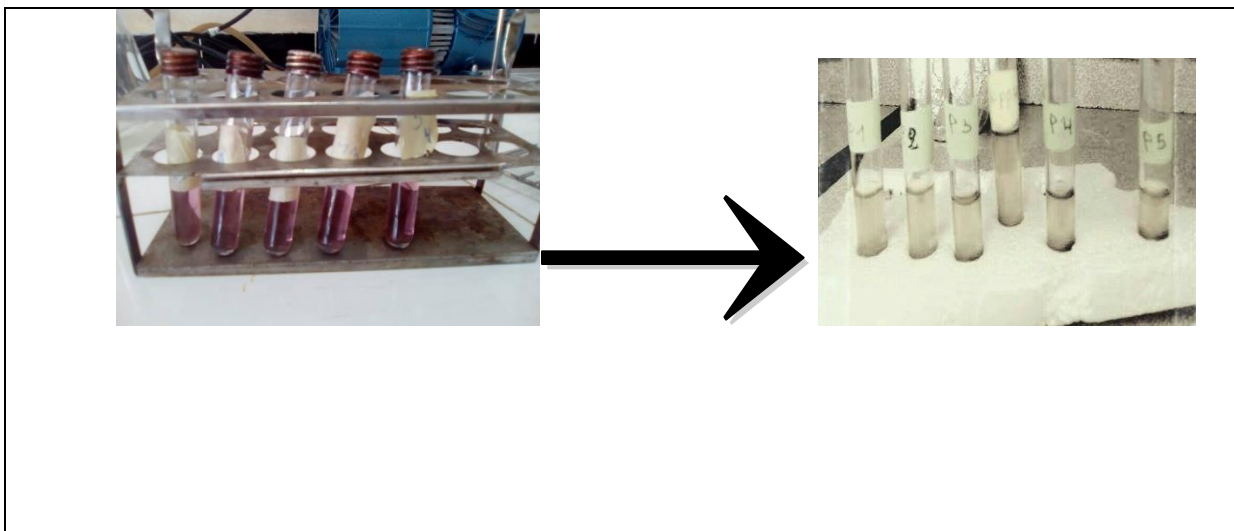
On remarque que l'HE de la marjolaine présente une activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* mais d'une manière différente d'un germe à autre.

### 3.6. L'activité antioxydante

#### 3.6.1. Test anti-radicalaire (test DPPH)

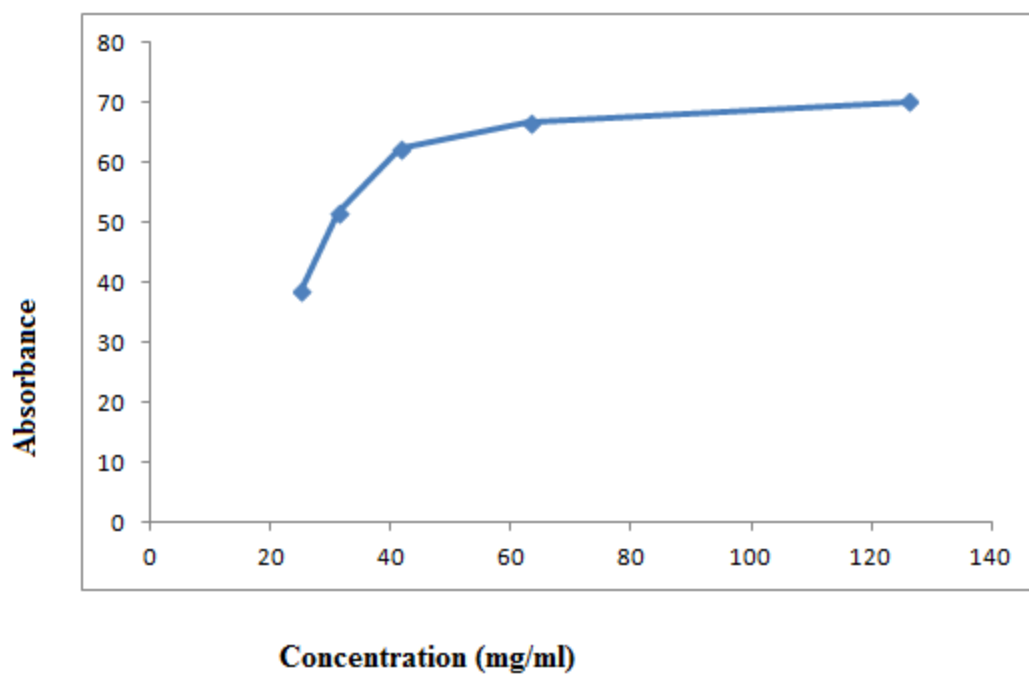
L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres, donc cette méthode est basée sur la réduction d'une solution éthanoïque de DPPH en présence d'un antioxydant, ce radical libre présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par substances antioxydant, la forme réduit conféré à la solution une coloration jaune pâle (**Figure 3.3**), le virage vers cette coloration et l'intensité de décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire. .[53]

L'activité antiradicalaire des différents extraits a été évaluée par le test au DPPH, celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les dilutions d'HE de la marjolaine.



**Figure 3.3** : virage de couleur violet sombre vers jaune pâle

L'absorbance du DPPH mesuré à 517 nm montre une chute de cette dernière dans un intervalle très réduit de concentration, ce qui est présentée dans la figure 3.4 ci-dessous.

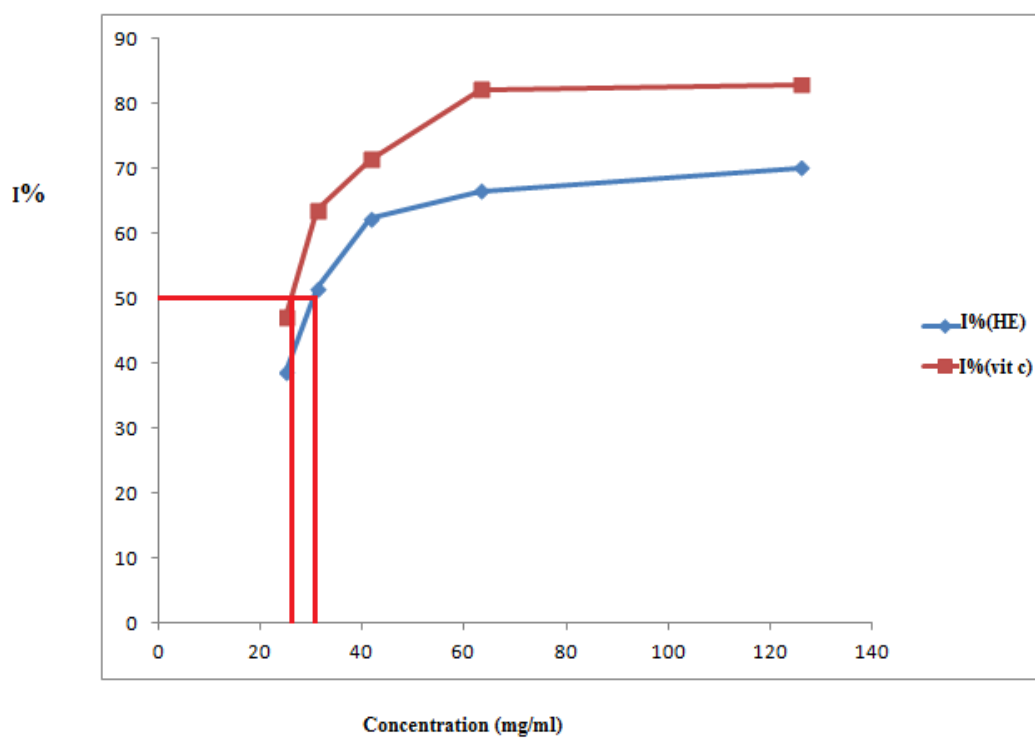


**Figure 3.4** :L'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration.

Les résultats obtenus lors du test de mesure le pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont représentés dans le (Tableau 3.9) et la (Figure 3.5).

**Tableau 3.9** : Le pourcentage d'inhibition du DPPH.

<b>Concentration mg/ml</b>	25	31.2	41.6	63	126
<b>Abs(HE)</b>	0.96	0.75	0.58	0.52	0.46
<b>I %(HE)</b>	38.5	51.6	62.4	66.6	70.1
<b>Abs(vit C)</b>	0.63	0.43	0.34	0.21	0.20
	5	7	3	3	5
<b>I %(vit C)</b>	47.0	63.8	71.4	82.2	82.9
	8	5	7	5	1



**Figure 3.5** : Evolution de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.

La figure représente le pourcentage d'inhibition de radical DPPH en fonction de concentration. Il montre que se dernier augmente avec l'augmentation des concentrations des extraits de notre espèces.

- **Détermination d'IC<sub>50</sub>**

IC<sub>50</sub> est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante de composé et grande, un exemple de calcul est schématisé dans la (**Figure 3.5**).

L'HE de *origanum majorana* pouvait ramener le radical libre stable 2.2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec un IC<sub>50</sub> de 30mg/ml

Ces résultats montrent que nos extraits possèdent une activité à céder le proton pour neutraliser le radical DPPH , donc une faible activité antioxydante. En comparaison avec les résultats de l'acide ascorbique qui a affiché une activité anti-radriculaire élevée.



## Conclusion générale

Un grand nombre des plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques.

La recherche de nouvelles plantes aromatiques à caractère thérapeutique à surtout servi à montré le bien fondé de leurs utilisations par les tradipraticiens. Elle a démontré aussi que notre pays recèle une biomasse végétale riche et variée. Celle-ci constitue une source incommensurable pour l'élaboration et la mise au point de nouvelles molécules actives à visé

Le contrôle de l'huile essentielle par les caractéristiques physiques et chimiques permet de mettre en évidence la qualité de cette huile, se distingue par un indice d'acide et des propriétés physiques et chimiques comparables à ceux obtenus par la littérature concernant les huiles essentielles d'une façon générale. Les résultats de notre travail nous permis de s'assurer de la pureté de cette huile essentielle. Cette huile essentielle montre la possibilité de l'utiliser dans la préparation pharmaceutique.

Notre étude avait pour but de mieux connaître la marjolaine travers l'étude de sa fraction aromatique (HE-HA). Nous avons pu montrer que l'huile essentielle est de couleur jaune, avec une odeur agréable et un gout caractéristique. Le rendement en huile essentielle dans les trois mois (février, mars et avril) est (0.65%, 2.1%, 2.25%) obtenu par l'hydrodistillation de plante est important, comparé avec le rendement en huiles essentielles d'autre plantes c'est (0.665%).

Les résultats de notre travail, de pH par un pH mètre (6.36, 6.14, 6.16), de pH par un papier (6, 6, 6) de densité (1.0026, 1.049, 1.050), l'indice de réfraction (1.4695, 1.470, 56.65), l'indice d'acides (0.03, 0.033, 0.033) et l'indice d'ester (56.97, 56.52, 56.6), nous permis de s'assurer de la pureté de cette huile essentielle. cette huile essentielle montre la possibilité de l'utiliser dans la préparation pharmaceutique.

De part son profil chromatographique, L'autre objectif était l'étude de la composition et des propriétés d'un produit secondaire de l'hydro distillation. Son activité biologique différente.

Outre ses potentialités antimicrobiennes et antioxydant vérifiées sur des germes standardisés en milieu gélosé et en phase vapeur, la fraction aromatique possède une action anti-antimicrobienne indéniable. De ce fait, elle pourra être proposée, éventuellement, comme un principe actif de choix dans le traitement local des inflammations.

Pour une meilleure exploitation industrielle, il convient donc d'extraire l'huile essentielle des feuilles de la marjolaine après une semaine de séchage après leur récolte, puisque la

teneur en huiles essentielles serait à son maximum. Au delà de cette période, elles perdent quantitativement leurs huiles essentielles.

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 pharmacopée. Les résultats de cette recherche pourraient avoir, à moyen terme, une incidence sur le développement durable du pays.

En somme, les potentialités de la marjolaine étant à peine entrevues. Elles ouvrent d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir. C'est aux biotechnologies végétales que leurs incombe la mission de mener des études supplémentaires afin de compléter le développement phytopharmaceutique.

En perspective, il serait intéressant, lors des hydro distillations, de récupérer l'hydrolat et d'analyser sa composition et son potentiel pharmacologique. N'ayant pas fait l'objet d'études scientifiques approfondies, ces eaux aromatiques constituent un créneau de recherche intéressant et d'approfondir les investigations photochimiques et biologiques sur ces plantes, notamment la purification et l'identification via l'étude photochimique et les analyses spectrales des extraits obtenus afin d'isoler les molécules responsables des activités antimicrobiennes, ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base des plantes et s'intéressé à la relation intime qui lie la structure chimique et l'activité des huiles essentielles qui constitue le fondement de l'aromathérapie scientifique et doit être étudié dans d'autres travaux, tel que l'application pratique dans l'industrie alimentaire pour réduire les impacts indésirables et de prolonger la durée de conservation. Ainsi des études complémentaires pourront être envisagées dans plusieurs domaines, dont, la composition chimique des résidus d'hydro distillation devrait être caractérisée pour connaître les composés responsables de l'activité antioxydant de la plante.

- [1]: ISERIN P., MASSON M., et RESLELLINI J., 2001. La rousse encyclopédie des plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition. Paris,235-240.
- [2]: HART T., et SHEARS P., 2002. Atlas de poche de Microbiologie Flammarion Médecine Sciences.3<sup>ème</sup> édition Paris, 213-215.
- [3]: EL KALAMOUNI C., RAYNAUD C., et TALOU T., 2010. "Design of an Artificial Crushing Finger Device for Rapid Evaluation of Essential Oils from Aromatic plants leaves." Expression of Multidisciplinary Flavour Science, 2<sup>ème</sup> édition. Imre Blank, Matthias Wüst, Chahan Yeretizian: 525-528.
- [4]: SIPAILIENE, A., VENSKUTONIS, P.R., BARANAUSKIENE, R. ET SARKINAS, A.,2006. Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oils." Journal of Essential Oil Research, 18: 698-703.
- [5]: NOSTRO A., GERMANO M. P., D'ANGELO V., MARINO A. ET CANNATELLI M.A., 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lettres en microbiologie appliquée. 30 (5), 379.
- [6]: FOUCHE J. G., MARQUET A. ET HAMBUECKERS A., 2000. Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman. édition,315.
- [7]: DWECK A. C., 2002. Herbal Medicine for the Skin. Their Chemistry and Effects on Skin and Mucous Membranes. Personal Care Magazine. 3(2), 19-21.
- [8]: SVOBODA K.P., et HAMPSON J.B., 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK, KA6 5HW.
- [9]: DELAVEAU P., 1987. Les Epices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Albin Michel Editeur. édition,372 .
- [10]: PORTER N., 2001. Essential oils and their production. Crop & Food Research. Number V :39.
- [11]: COUIC-MARINIER F., Lobstein A. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualités pharmaceutiques 2013; 52 (525) : 18-21.
- [12]: BENJILALI B. Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 2004 : 17-59.

- [13]: JOULAIN D. Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse, *Perfumer & Flavorist*, 1994; 19: 5-17.
- [14]: PLATZER N. Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Référence : P1092, 2002.
- [15]: BRUNETON J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 1999, 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- [16]: INOUYE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). *Int J Aromather* 2003; 13 (2-3): 95-107.
- [17]: KUNLE O, OKOGUN J., et al. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine* 2003; 10: 59-61.
- [18]: DORMAN H. J. D. et Deans S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88(2): 308-16.
- [19]: BURT, S. A. et REINDERS R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol*. 2003; 36(3):162-7.
- [20]: KALEMBAD, KUNICKAA. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Med Chem* 2003; 10(10): 813-29.
- [21]: ZAIKAL. L. Spices and Herbs - Their antimicrobial activity and its determination. *J Food Safety* 1988; 9(2): 97-118.
- [22]: ASSAF, M. H., A. A. ALI, M. A. MAKBOUL, J. P. Beck & R. Anton: Preliminary study of phenolic glycosides from *Origanum majorana*; quantitative estimation of arbutin; cytotoxic activity of hydroquinone. *Planta Medica* 1987, 53, 343-345.
- [23]: DUBOIS J., MITTERAND H., D DAUZAT A. - 2006 – Dictionnaire étymologique et historique du français – Larousse.
- [24]: VERA R.R. et CHANE-MING J. (1999) Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. *Food Chemistry* 66 (1999) 143-145.
- [25]: FURIA, T. E., Sc Bellanca, N. (1971). Fenaroli's handbook of flavor ingredients, The Chemical Rubber Co., Cleveland, OH.
- [26]: CHUNG, Y. K., H. J. HEO, E. K. KIM, T. L. HUH, Y. LIM, S. K. KIM & D. H. SHIN: Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Mol. Cells* 2001, 11, 137-143.
- [27]: BURT, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- [28]: VAGI, RAPAVI, M. HADOLIN, K. VASARHELYINEP ERIDI, A. BALAZS, A. BLAZOVICS ET B. SIMANDI. Phenolic and Triterpenoid Antioxidants from *Origanum*

majorana L. Herb and Extracts Obtained with Different Solvents. J. Agric. Food Chem., 2005, 53 (1), pp 17-21.

[29]: KOMAITIS M. E.(1992). Composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.). Food Chemistry 45(1992) 117-118.

[30]: TRIANTAPHYLLOUK., BLEKAS G., BOSKOU D. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 2001, Vol. 52, No. 4, Pages 313-317.

[31]: SOLIMAN F. M., YOUSIF M. F., ZAGHLOULS. S., and OKBA M. M. (2007), Comparative botanical study, DNA fingerprinting and proximate analysis of *Origanum syriacum* L. subsp. *sinaicum* Greuter and Burdet and *Origanum majorana* L. Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ. 45, 157 – 180.

[32]: IETSWAART J.H.A., (1980), Taxonomic Revision of the genus *Origanum* (Labiatae), Leiden Botanical Series, Vol 4, Leiden University Press, The Hague, Netherlands.

[33]: CHOUITAH O, 2011, "composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles des feuilles de *Gheyrhiza ylafra* ", thèse de doctorat, Faculté des sciences, Université d'Oran.

[34]: AFNOR,2000, Huiles essentielles, Echantillonnage et méthodes d'analyse monographis relatives aux huiles essentielles(Tome2).

[35]: AFNOR, 1989, "Les huiles essentielles", 3<sup>ème</sup> Edition, Recueil des normes française, Paris.

[36]: MAZOUZ B, HAHDAOUI A,2010, "Caractérisation et l'étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle des grains de *petroselinum sativum*", Thèse d'ingénieur d'état en biologie, Faculté des sciences agronomiques et des sciences biologiques, Université Hassiba Ben Bouali-chlef.

[37]: ZINET H, MEHABLI M, 2013, "Composition chimique, Activité Antibactérienne et Activité larvicide des huiles essentielles de l'*Ocimum basilicum*" ; Thèse de Master. Faculté de science et technologie. Université de khemis Miliana.

[38]: MOHAMDI Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, magistère Université Abou Bakar Bel Kaid Tlemcen, p105.

[39]: CACHAU-HERREILLAT, 2005, « Des expériences de la famille acide-base », 2<sup>ème</sup> éd., De Boeck

- [40] : NAIT ACHOUR KH, 2012, "Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'eucalyptus possant dans la région de Tizi Ouzou", Thèse de Magister, Faculté des Sciences, Université de Mouloud Mameri-Tizi Ouzou.
- [41] : AFNOR ,2004. Huiles essentielles. Ed.PARA Graphie.Tome2.Vol 1 Monographie relative ux huiles essentielles.323p.
- [42] : CHABANNE A., BOYER J., MICHELLON R., et SEGUY L., 2001. Impacts des couvertures végétales sur la production de *Pelargonium x Asperum* et sur la biologie du sol (macrofaune) à l'île de La Réunion. World Congress on Conservation Agriculture Madrid, 1-5 October, 35p.
- [43] : GOUMNI Z, SALHI A, 2013, "Etudes de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extrait de la plante *Laurus Nobilis L*". Thèse de Master Faculté de Science et de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Kasdi Merbah-Ouragla.
- [44] : Document édité avec la collaboration de l'OMS, 2011, « Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale », 6<sup>ème</sup> Edition, Algérie.
- [45] : METCHAT S, 2012, "Etudes des caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles extraites à partir des graines de *Petroselinium sativum* et de *Apium graveleons*", Thèse de Master, Faculté des sciences, Université Hassiba Ben Bouali-CHlef.
- [46] : NOURACHANI I,2010, "Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle des écorces de *Cryptocarya crassifolia* (Lauraceae)", Mémoire d'études approfondies, (DOA) Département de biochimie fondamentale et appliquée, Université D'intananarivo.
- [47] : CHIKI I, 2014, "composition chimique et activités biologique des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest d'Algérie", Thèse de doctorat, aculté des sciences, Université de Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.
- [48] : WILLIAMS DAVID G. The chemistry of essential oils: an introduction for aromatherapists, beauticians, retailers and students. Editions : 1997, 1996.
- [49] : KAHOULI I, 2010, effet antioxydant d'extraits (*Laurus nobilis L.*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Olea Europea L.*) Dans l'huile de canola chauffée Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en génie agroalimentaire pour l'obtention du grade de Maître es science (M.Sc.)
- [50] : DE CLLIF S.et HARERIMANA P.C, 2013 extraction des huiles essentielles compété des fleurs de *gananga odorata* de la plaine de l'imbo :vers la vulgarisation d'une nouvelle

filère de plante industrielle au burundi. Revue de l'université de burundi, série science exacte V :28 :1-17.

[51] : ALAOUI BOUKHRIS M. 2010. Activités larvicides des extraits de plantes sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaires. Master Sciences et Techniques : CMBA Chimie des Molécules Bio Actives.

[52] : Gilles FIGUEREDO. Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (*Lamiaceae*) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL (U.F.R. Sciences et technologie).

[53] : HEIMAN FL WERTHEIM , 2005, Damian C Melles, Margreet C Vos, Willem van Leeuwen, Alex van Belkum, Henri A Verbrugh et Jan L Nouwen, «*The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*», *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 5, n° 12, 2005, p. 751–762





## **Annexe**

### **➤Appareillage, verrerie et consommables**

#### **Liste des appareillages :**

- Autoclave
- Balance de précision
- Bain marie
- Chauffe ballon
- Centrifugeuse de paillasse
- Chromatographe en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
- Etuve bactériologique
- Hydrodistillateur type Clevenger
- Plaque chauffante
- pH-mètre et papier de pH
- Réfractomètre de précision

#### **Liste de la verrerie et consommables**

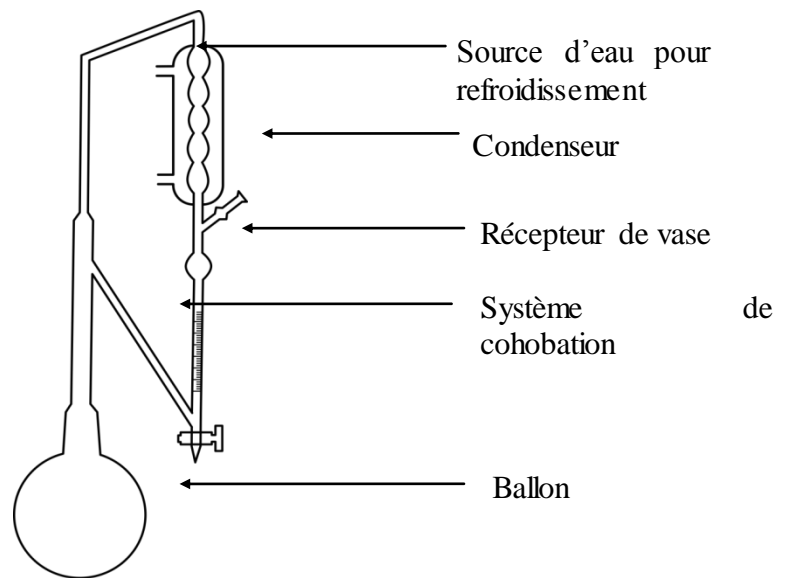
- Bêchers : 100 ml, 250 ml, 500 ml
- Ballon
- Burette 20 ml
- Boîtes de pétri stériles
- Disques Stériles
- Écouillons Stériles
- Erlenmeyer 25ml
- Eppendorfs
- Fiole jaugé
- Pipettes graduées stériles
- Spatule inox
- Pipettes Pasteurs
- Tubes à essai

#### **Liste des solutions et réactifs utilisés :**

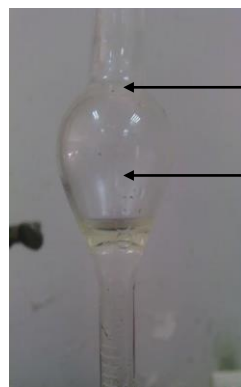
- Acide chlorhydrique (HCl) : 0,5 mol/l

- Eau distillée
- Ethanol
- Hydroxyde de potassium (KOH) : 0,01 mol/l et 0,5 mol/l
- phénol phtaléine
- Eau distillée stérile

➤ Photos de quelques appareils et tests biologiques et montages :



Appareil de Clevenger pour l'hydro distillation



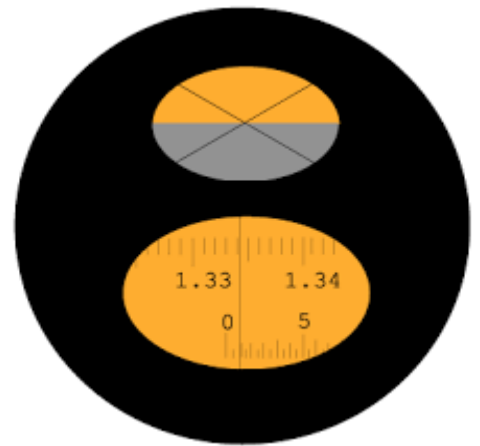
Phase organique (Huile essentielle)  
Phase aqueuse (hydrolat)

La phases



formation de deux

Le pH mètre



Réfractomètre



Dispositif de titrage pour définir l'indice d'acide



Dispositif de titrage pour définir l'indice d'ester

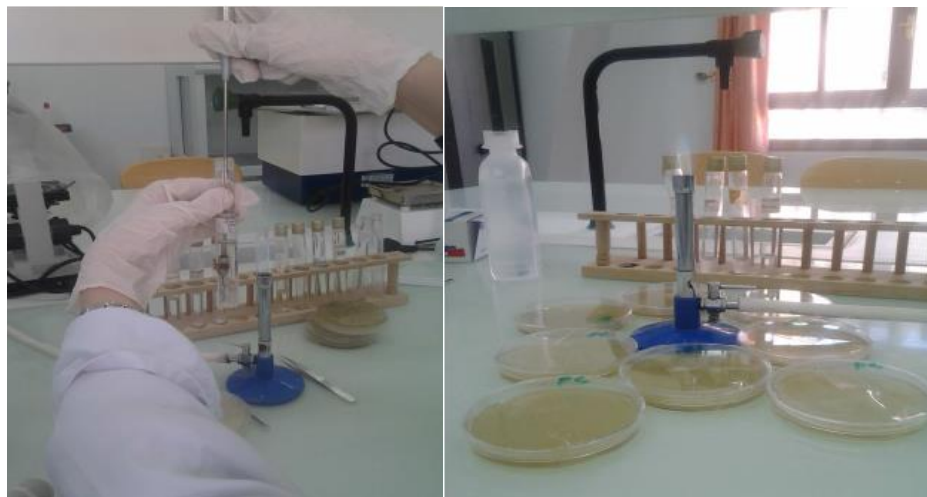


Montage de mesure de l'indice ester.

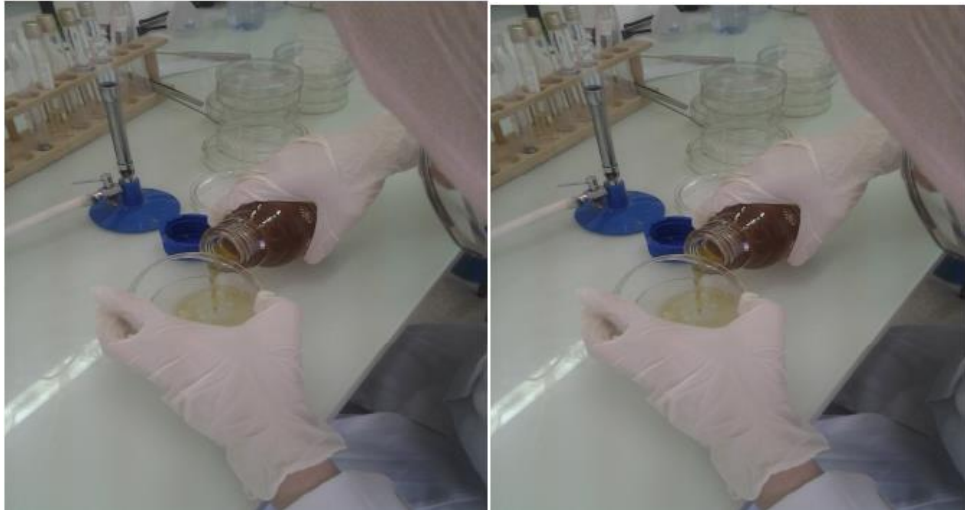


Titrage par KOH(0.01N).

Les souches bactériennes



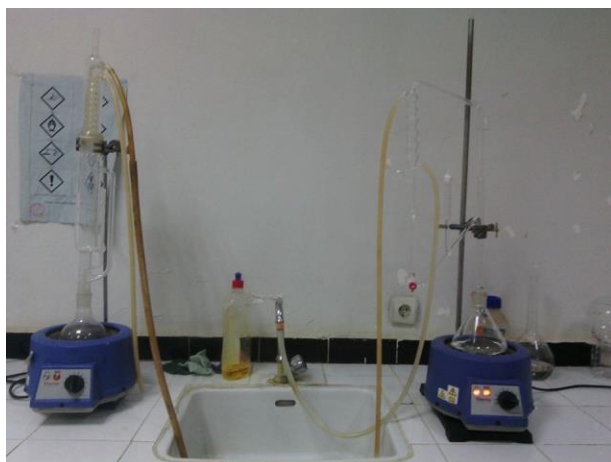
Préparation de l'inoculum



Boite pétri coulée en milieu de culture



Appareil GC/MS



Montage de Hydrodistillateur type Clevenger





Figure 2.17 : Spectrophotomètre UV-Visible

➤ **Préparations des solutions**

**KOH (0.01N) :**

$$m = M_m \cdot c \cdot v \rightarrow m = 56.1 \cdot 0.01 \cdot 500 \cdot 10^{-3}$$

$$m_{\text{KOH}} = 0.285 \text{ g}$$

on pèse 0.2805 g de KOH solide, dans une fiole jaugée remplie par l'eau distillé jusqu'à 500 ml



Préparation de KOH

**HCl (0.5N)**

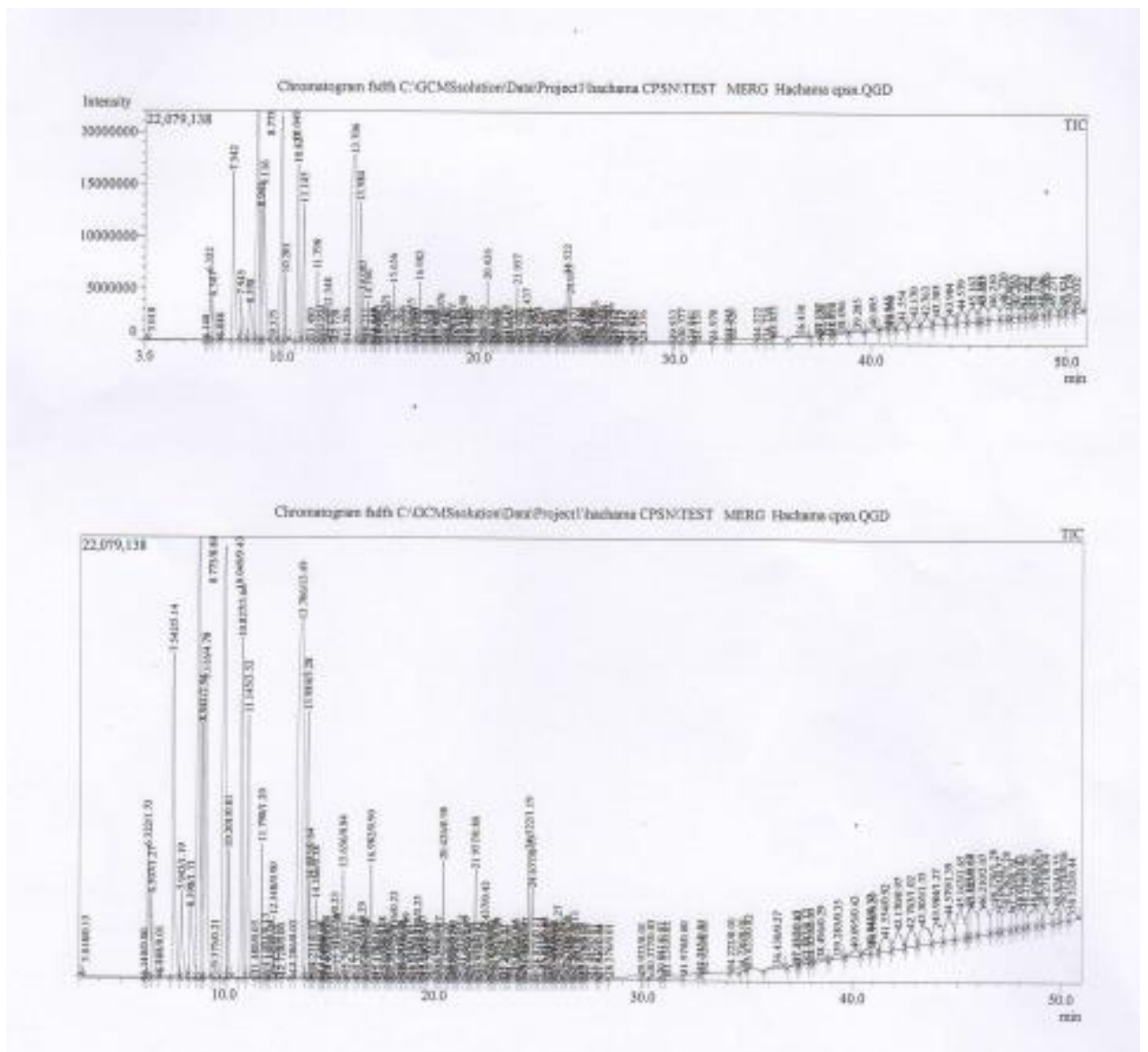
1N  $\rightarrow$  85.2 ml de HCl dans 1L de l'eau distillé.

Pour 0.5N on prend 42.6 ml de HCl dans une fiole jaugée et compléter avec l'eau distillé jusqu'à 1L.



Préparation de l'HCl

➤ Résultats de chromatographie



Cromatogramme de l'huile essentielle de l'origanum majorana.



