

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre
Département: Sciences biologiques
Spécialité: Microbiologie appliquée

Mémoire de Fin d'Études pour l'obtention du diplôme de master

Thème :

*Extraction et activité biologique des huiles
essentielles d'Origanum majorana*

Présenté par :

- ❖ Melle Mebdoua Maroua
- ❖ Melle Aouabed Hadjira

Devant le jury composé de :

Mme GUITARNI H., MCA à UDB KhemisMiliana,	Présidente
Mme SAADI F., MCB à UDB Khemis Miliana,	Examinatrice
Mr BRADA M., Prof à UDB Khemis Miliana,	Encadreur

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Nous tenons à remercier tout abord Le « Bon Dieu » tout puissant de nous avoir donné la force, la santé, la volonté et le courage qui nous a permis de réaliser ce travail et d'arriver au terme de nos études dans des bonnes conditions.

Nous commençons par exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements au professeur Brada Moussa qui nous a honoré en acceptant de mener ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

On adresse nos sincères remerciements à «Madame Guitarni » Maitre-conférence à l'Université Djilali Bounaama Khemis Miliana d'avoir accepté de présider le jury. Nous tenons également à adresser nos vifs remerciements à « Madame Saadi » Maitre-assistante à l'Université Djilali Bounaama Khemis Miliana, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous tenons également à remercier notre famille, en particulier nos parents qui nous laissent toujours choisir notre propre chemin. Vous étiez toujours là tant par votre soutien moral que financier.

DEDICACES

Je dédie ce travail à mes très chers parents

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez,
Vous avez toujours été présents pour les bons conseils et pour mener
à bien mes études.*

MAROUA

DEDICACES

*Avec un sentiment particulier de gratitude à mes parents qui m'ont
doté d'une éducation digne,*

Je dédie ce travail :

À ma mère, pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices

A mon père, pour son soutien, son affection et sa confiance en moi

A tous ceux qui m'aiment...

HADJIRA

Résumé

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation d'une plante aromatique médicinale qui appartient à la famille de Lamiaceae : *Origanum majorana* L., provenant de la région de Khemis Miliana. L'objectif est de réaliser l'extraction de ses huiles essentielles (HE), déterminer sa composition chimique et d'évaluer leurs activités antioxydante et antimicrobienne. Selon les résultats rapportés par la littérature, les huiles essentielles d'*O. majorana* manifestent des caractéristiques antimicrobienne et antioxydante très intéressantes. L'extraction des HE a donné des rendements variables entre les différents pays de (0,61 - 3%). Les analyses chromatographiques ont montré la présence du bornéol (15.5%), eucalyptol (11.3%), terpinéol (13.9%) et le 4-terpinéol (13.9%) en Algérie et linalool, thymol, γ -terpinène, carvacrol, thymol, l'hydrate de cis-sabinène, α -terpinène dans divers pays du monde. L'HE d'*O. majorana* présente un fort pouvoir antioxydant avec une IC_{50} allant de 30-6800 $\mu\text{g/mL}$. Concernant l'activité antimicrobienne, les souches les plus sensibles étaient: *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*. L'HE d'*O. majorana* pourrait être exploitée et utilisée dans le domaine agroalimentaire et/ou pharmaceutique.

Mots clés : *Origanum majorana*, Huile essentielle, Extraction, GC/MS, Activité biologique.

ملخص

هذه الدراسة جزء من تقييم نبات طبي عطري ينتمي إلى فصيلة *lamiacea* : *Origanum majorana* ، من منطقة خميس مليانة . الهدف هو استخراج زيوتها الأساسية ، وتحديد تركيبها الكيميائية وتقييم أنشطتها المضادة للأكسدة والميكروبات. وفقًا للنتائج الواردة في الأدبيات ، يمكننا القول أن الزيوت الأساسية لـ *O. majorana* تظهر خصائص مثيرة للاهتمام للغاية من مضادات الميكروبات ومضادات الأكسدة . استخراج الزيت العطري أعطى عوائد متغيرة بين الدول المختلفة (0.61 - 3%) . أظهرت التحاليل الكروماتوجرافية وجود borneol (15.5%) ، cineol 1,8 (11.3%) ، terpineol (13.9%) و 4-terpineol (13.9%) في الجزائر و linalool ، thymol ، γ -terpinene ، carvacrol ، α -terpinene ، l'hydrate de cis-sabinène ، في مختلف دول العالم. . الزيت الأساسي لـ *O. majorana* لديه قوة فائقة مضادة للأكسدة مع درجة تركيز IC50 تتراوح من 30-6800 ميكروغرام / مل. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للميكروبات ، كانت السلالات الأكثر حساسية هي: *E. coli* ، *Bacillus subtilis* ، *Enterococcus faecalis* ، *Pseudomonas aeruginosa* و *Candida albicans* ، *Aspergillus flavus* . يمكن استغلال الزيت الأساسي لـ *O. majorana* واستخدامها في قطاع الأغذية و / أو الأدوية.

الكلمات المفتاحية: *Origanum majorana* ، زيت عطري ، استخراج ، GC/MS ، النشاط البيولوجي.

Abstract

This study is part of the valuation of a medicinal aromatic plant that belongs to the Lamiacea family: *Origanum majorana* L., from the Khemis Miliana region. The objective is to extract its essential oils (EO), determine its chemical composition and evaluate their antioxidant and antimicrobial activities. According to the results reported by the literature we can say that the essential oils of *O. majorana* exhibit very interesting antimicrobial and antioxidant characteristics. The EO extraction gave variable yields between different countries of (0.61 - 3%). The Chromatographic analyzes showed the presence of borneol (15.5%), eucalyptol (11.3%), terpineol (13.9%) and 4-terpineol (13.9%) in Algeria and linalool, thymol, γ -terpinene, carvacrol, thymol, cis-sabinene hydrate, α -terpinene in various countries of the world. *O. majorana* EO has a strong antioxidant power with IC50 ranging from 30 mg / ml to 6800 (ug / ml). Regarding antimicrobial activity, the most sensitive strains were: *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*. The *O. majorana* EO could be exploited and used in the agri-food and / or pharmaceutical sector.

Keywords: *Origanum*, *Origanum majorana*, Essential oil, Extraction, GC/MS, Biological activity.

Liste des abréviations

AAI : Indice de l'activité antioxydante

Abs : Absorbance

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ARN: Acide ribonucléique

A. parasiticus: *Aspergillus parasiticus*

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

BHT: Butyl hydroxytoluène

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée par la spectrométrie de masse

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DPPH : 2, 2'-diphényl-1-picrylhydrazyle

E.coli : *Escherichia coli*

FID: Détecteur à ionisation de flamme

GM : Gentamicine

GN : Gélose nutritive

H%: Taux d'humidité en %

HE: Huile essentielle

I% : Pourcentage d'inhibition

IA : Indice d'acide

IC50 : Concentration inhibitrice à 50% (IC50)

I_e : Indice d'ester

Is : Indice de saponification

KOH : Hydroxyde de potassium

MH : Milieu Mueller Hilton

MHB : Bouillon Mueller Hinton

NBT: Nitroblue tetrazolium

O. majorana L. : *Origanum majorana L.*

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

RHE : Rendement d'extraction d'huile essentielle.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

UFC : Unité formant colonie

UI : Unité internationale

ZI: Zone d'inhibition

Liste des tableaux

Tableau I. Eléments nutritionnelles présent dans l' <i>O. majorana</i> (Tripathy et al., 2017).	15
Tableau II. Utilisations ethnomédicinales d' <i>Origanum majorana</i> (Bina et al., 2017).....	17
Tableau III. Rendements d'HE d' <i>Origanum majorana</i> dans différents pays.	22
Tableau IV. Caractéristiques des huiles essentielles d' <i>Origanum majorana</i>	23
Tableau V. Les principaux constituants de l'HE d' <i>O. majorana</i> de divers pays.	25
Tableau VI. Activité antioxydante des huiles essentielles d' <i>O. majorana</i>	31

Liste des figures

Figure 1. Aire de répartition du genre <i>Origanum</i> (Figueredo, 2007).....	8
Figure 2. <i>Origanum majorana</i>	10
Figure 3. Aspect morphologique d' <i>Origanum majorana</i> (oskamp, 1796)	11
Figure 4. Structure de certains des principaux composés actifs d' <i>Origanum majorana</i> (Bina et al., 2017)	14
Figure 5. Appareillage d'extraction par hydrodistillation type clevenger (Boucekrit, 2018)	36
Figure 6. Extraction par entrainement à la vapeur (Mnayer, 2014)	37
Figure 7. Structure chimique du radical libre DPPH (Popovici et al., 2009).....	48
Figure 8. La forme radicale du DPPH et sa réduction par un antioxydant (Boucekrit, 2018)	48
Figure 9. Illustration de la méthode d'aromatogramme (Soulet, 2017)	52
Figure 10. Technique de diffusion sur gélose par disque (Boucekrit, 2018)	54

Table de matière

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	
I. Le matériel végétal : <i>Origanum majorana</i>	4
1. Famille des Lamiacées	4
2. Genre <i>Origanum</i>	6
2.1. Présentation et description général	6
2.2. Description botanique	7
2.3. Répartition géographique	7
2.4. Distribution géographique en Algérie.....	8
2.5. Exigences écologiques et culture	9
2.6. Composants primordiaux des huiles essentielles d'origan.....	9
3. <i>Origanum majorana L.</i>	10
3.1. Description botanique	11
3.2. Classification	12
3.3. Habitat et culture	12
3.4. Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Origanum majorana L.</i>	13
3.5. Éléments présents dans l' <i>Origanum majorana</i>	15
3.6. Usages et propriétés médicinales de l' <i>Origanum majorana</i>	16
3.7. Activités pharmacologiques d' <i>Origanum majorana</i>	18
II. Travaux antérieurs	21
1. Rendement en huile essentielle d' <i>Origanum majorana</i> dans différents pays.....	21
2. Caractérisation organoleptique et propriétés physico-chimiques des huiles essentielles d' <i>Origanum majorana</i> dans le monde	23

3. Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Origanum majorana</i>	24
3.1. <i>Origanum majorana</i> d'Algérie.....	24
3.2. <i>Origanum majorana</i> de Maroc.....	24
3.3. <i>Origanum majorana</i> de Tunisie.....	25
3.4. Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Origanum majorana</i> dans divers pays du monde.....	25
4. Activité biologique de l'huile essentielle d' <i>Origanum majorana</i>	27
4.1. Activité antimicrobienne	27
4.2. Activité antibactérienne	27
4.3. Activité antifongique	29
4.4. Activité antioxydant	30

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Introduction	33
I. Matériel	33
1. Matériel végétal	33
2. Matériel biologique.....	33
3. Matériel de laboratoire	34
II. Méthodes	35
1. Extraction des huiles essentielles	35
1.1. Hydrodistillation.....	35
1.2. Entraînement à la vapeur d'eau.....	37
2. Détermination de taux d'humidité.....	38
3. Calcul du rendement en huiles essentielles.....	38
4. Cinétique d'extraction de l'huile essentielle.....	38
5. Analyses des huiles essentielles extraites.....	39
5.1. Détermination les caractéristiques des huiles essentielles.....	39
5.1.1. Propriétés organoleptiques d'huiles essentielles.....	39
5.1.2. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles étudiées.....	39
5.1.2.1. Propriétés physiques.....	39
5.1.2.2. Propriétés chimiques.....	41
5.2. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles.....	43

5.2.1. Chromatographie en phase gazeuse.....	43
5.2.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	45
6- Activités biologiques des huiles essentielles	46
6.1. Évaluation de l'activité antioxydant.....	46
6.1.1. Radicaux libres et le stress oxydatif.....	46
6.1.2. Antioxydants.....	47
6.1.3. Méthodes d'étude de l'activité des antioxydants.....	47
6.1.3.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH	47
6.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	50
6.2.1. Activité antibactérienne.....	50
6.2.2. Activité antifongique.....	50
6.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	51
6.2.3. Étude qualitative de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle.....	51
6.2.4. Étude quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle.....	55

Chapitre III. Résultats et discussion

Résultats.....	58
Conclusion	59
Références bibliographiques	61

Introduction générale

Introduction

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée au développement des civilisations. Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans l'environnement, afin de traiter et soigner des maladies. Ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires, et représentent un réservoir intéressant et inépuisable de nouveaux composés bioactifs attribués aux métabolites secondaires qui possède différentes propriétés (**Amarti et al., 2011 ; Makhloufi, 2010 ; Zeghad, 2009**). Ces composés sont recherchés pour détecter de nouveaux traitements efficaces contre les maladies non traitées et pour réduire l'utilisation de produits synthétiques qui sont nocifs à l'homme et à son environnement (**Zekri, 2017**).

Une plante médicinale c'est toute plante utilisée en médecine qui renferme un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, guérir ou soulager des maladies et pour le maintien d'une bonne santé (**El Amri et al., 2014 ; Makhloufi, 2010**). Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent l'application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétique et agriculture grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles (**Bouhdid et al., 2006 ; Laghouiter et al., 2015**).

De nos jours entre 20 000 et 25 000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale (**Anthoula, 2003**). L'une des valorisations de ces ressources naturelles végétales passe par l'extraction et l'étude de caractéristiques physico-chimiques de leurs huiles essentielles.

L'Algérie, de par sa situation géographique et son climat méditerranéen, est douée d'une flore riche et diversifiée. Cependant, il y a un manque d'études sur la distribution, l'importance et la productivité des plantes médicinales et les vertus qu'elles peuvent engendrer. Et malheureusement, toute cette richesse ne peut être estimée ou exploitée. L'institut national de la recherche agronomique d'Algérie a annoncé que l'Algérie n'utilisait que 1% des 1600 espèces spontanées et cultivées (**Bessah et Benyoussef., 2015**).

La famille des Lamiaceae est l'une des familles les plus importantes de la flore algérienne et l'une des plus utilisées par les thérapeutes traditionnels en tant que source mondiale d'espèces et d'extraits à fort pouvoir antibactérien et antioxydant . Les espèces de

Introduction

cette famille sont bien connues pour leur rôle essentiel dans la production des huiles essentielles auxquelles leur activité biologique a été attribuée (**Kechar et al., 2017; Sari, 2018**).

Dans cette famille l'*origan* est largement connu par les peuples de l'Antiquité et dans le monde des herbes et des épices pour son goût prononcé, ses vertus médicinales et pour ses huiles volatiles (**Medjahed et al., 2019 ; Sari, 2018**). Parmi les espèces de ce genre, il existe certaines plantes considérées comme les plus aromatiques du monde végétal, citons par exemple la marjolaine (*O. majorana L*) cette dernière populairement appelée " Merdgouche ".

Face à la perte d'efficacité des traitements comme les antibiotiques due à l'apparition de la résistance microbienne aux antibiotiques et aux antifongiques de synthèse suit à l'usage excessif et abusive de ces derniers dans la médication humaine et dans la conservation des aliments , de plus de la toxicité des antioxydants synthétiques qui sont suspectés d'avoir des effets néfastes sur la santé du consommateur (**Boudjouref, 2011 ; Abou et Fareh.,2017 ; Deshmane et al.,2007; Bekka, 2009**). Il y a un grand besoin de la découverte de nouvelles molécules naturelles plus actives, qui ont des effets antibactériens et antioxydants et sans effets indésirables pour leur utilisation comme des alternatives à des substances chimiques afin de traiter ces phénomènes de résistance bactérienne et d'oxydation des aliments (**Boucekrit, 2018 ; Belal et al., 2019; Toure, 2015; Moussaoui et al., 2016**).

Bien que les champs d'investigation pour surmonter et contrôler cette situation sont vastes mais l'intérêt pour l'utilisation des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles comme source potentielle de ces molécules bioactives en augmente, D'autant que les connaissances et les preuves empiriques sur l'utilisation d'*Origanum majorana* en médecine traditionnelle sont encore peu nombreuses (**Deshmane et al., 2007**).

A cet effet et dans le cadre de la poursuite de la valorisation du pouvoir antimicrobien et antioxydant des plantes médicinales et aromatiques algériennes qui peut avoir des retombées économiques considérables pour notre pays, et compte tenu des vertus thérapeutiques que représentent les lamiacées ainsi que la recherche de nouvelles molécules bioactives, nous nous sommes intéressés à étudier l'HE d'une plante de la famille de lamiacée : *Origanum majorana* de la wilaya d'Ain defla, afin de déterminer leur composition chimique et leurs propriétés biologiques.

Ce travail a pour objectif l'extraction, la récupération et la valorisation des huiles essentielles de la plante et renforcer la connaissance de sa composition chimique et de

Introduction

poursuivre ces activités pour une utilisation possible comme alternative aux additifs synthétiques.

La présente étude consiste en l'extraction par hydrodistillation, l'étude de la composition chimique et ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Origanum majorana*.

Ce travail se subdivise en trois chapitres:

Dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique relative aux généralités concernant la matière végétale et les travaux antérieurs réalisés sur *l'Origanum majorana*.

Le deuxième chapitre comporte le matériel utilisé et les méthodes adoptées dans les différentes études.

Le troisième chapitre présente les différents résultats obtenus et leurs discussions.

Enfin, une conclusion générale résumant les différents résultats obtenus de cette étude et dégageant les principales perspectives d'élargissement de ce travail.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

I. Matériel végétal : *Origanum*

Les plantes aromatiques et médicinales considérées comme étant une source inépuisable de remèdes thérapeutiques traditionnels naturels et efficaces utilisées à la fois en traitement curative et préventive en raison de leur richesse de composants de valeur ajoutée tels que : les flavonoïdes, les alcaloïdes, hétérosides, saponosides, quinones, vitamines,...et les huiles essentielles. Ces plantes possèdent des propriétés biologiques intéressantes qui sont susceptibles d'être utilisées dans divers domaines: en médecine, pharmacie, cosmétique et en agriculture (**Carović-Stanko et al., 2016 ; Fyad et al., 2013 ; Kpadonou et al., 2019**).

Les huiles essentielles sont des substances naturels volatiles, issus du métabolisme secondaire des plantes médicinales. Elles sont connues depuis l'antiquité et ont toujours occupé une place importante pour leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, antiseptiques, analgésiques et anti-inflammatoires. Elles sont utilisées dans diverses industries pharmaceutiques, cosmétiques, agroalimentaires et dans les préparations culinaires (**Bakkali et al., 2008 ; Amarti et al., 2011**). Elles représentent une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche d'une immense variété de molécules bioactives. Les huiles essentielles sont particulièrement abondantes chez certaines familles aromatiques, Parmi lesquelles les plus représentatives sont: les Conifères, les Ombellifères, les Rutacées, les Myrtacées et les Lamiacées (**Kabera et al., 2005 ; Fyad et al., 2013**) .

Nombreuses de ces espèces aromatiques appartiennent à la famille des Lamiacées. Au sein de cette famille, l'origan est l'une des plantes aromatiques les plus utilisées (**De Falco et al., 2013**).

1. Famille des Lamiacées

L'ordre des Lamiales est un ensemble important comprenant actuellement 17.800 espèces réparties en 21 familles; l'une des principales est celle des Lamiacées, autrefois appelée Labiées provenant du mot grec *laimos* (**Belmont, 2013**), du Latin (*Labia*): lèvre signifiant que la forme des fleurs est caractérisés par deux lèvres (**Moussaoui et Talit., 2016**) comprennent environ 260 genres et 7000 espèces largement distribuées dans la région méditerranéenne (**Mechergui et al., 2010**). Cette famille et par la particularité de ses caractères était l'une des premières à être distinguées par les botanistes.

Les plantes de cette famille sont habituellement des plantes herbacées odorantes, caractérisées par des tiges quadrangulaires, feuilles en général opposées sans stipules (**Moussaoui et Talit., 2016**), les inflorescences formées par de faux verticilles axillaires ou glomérules proviennent de la réunion de 2 cymes bipares, les fleurs hermaphrodites ou unisexuées et zygomorphes sont accompagnées de bractéoles, le calice est gamosépale persistant à 5 sépales soudés. La corolle est sympétale et typiquement bilabée, avec deux lobes formant une lèvre supérieure et trois lobes formant la lèvre inférieure, les étamines sont au nombre de 4 : 2 grandes et 2 petites ; L'androcée peut consister soit en quatre étamines didyames, soit en seulement deux étamines soudées au tube de la corolle ou à la zone périgyne et alternant avec les lobes. Le fruit est un tétrakène formé de 4 nucules secs enveloppés par le calice (**Boutlelis et Bordjiba., 2014, Mahfouf, 2018**).

Les Lamiacées sont l'une des principales familles botaniques connues par leurs richesses en huiles, cette famille est répandue dans diverses régions du monde particulièrement dans le Bassin méditerranéen jusqu'en Asie centrale. De nombreuses espèces sont cultivées dans les jardins, comme plantes ornementales et pour leurs propriétés médicinales et se retrouvent presque sous tous les climats et à toutes les altitudes. Certains de ses genres sont quasiment cosmopolites, d'autres ont une distribution plus restreinte. En Algérie, il y'a 145 espèces qui sont répertoriées dans tous les territoires (**Sari, 2018 ; Belmont, 2013 ; Boutlelis et Bordjiba., 2014**).

L'origan, le thym, le romarin et la sauge appartiennent à cette famille et sont les plantes aromatiques les plus populaires dans les remèdes traditionnels et modernes et dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (**Nieto, 2017**). Ces plantes sont bien connues pour leur teneur en huile essentielle et en composés phénoliques auxquels leur activité biologique était attribuée (**Hanana et al., 2017**).

Les activités pharmacologiques et la bioactivité des espèces de cette famille sont associées à leurs composants en huiles essentielles et sont connues depuis des années (**Maral et al., 2017**).

Au sein de cette famille, le genre *Origanum* est l'une des plantes les plus importantes économiquement, en raison de sa grande diversité chimique et morphologique et de leur utilisation comme épices très populaires dans le monde entier (**Mechergui et al., 2010**).

2. Genre *Origanum*

2.1. Présentation et description général

Le terme « Origan » est apparu dans la langue au XIII^e siècle (**Bouhadouda, 2016**). Oregano en Anglais, il dérive du latin *origanum*, qui est lui-même issu du grec ancien origanon qui composé de deux mots : oros « montagne » et « ganos »: éclat, beauté, qui signifie "ornement des montagnes" Communément appelé « joie des montagnes » ou « parure de montagnes » en raison de leur beauté et leur abondance sur les montagnes méditerranéennes puisque cette plante préfère des altitudes élevées de 400-1800 m dans le climat méditerranéen et dans les endroits ensoleillés (**Vasudeva et Goel, 2015 ; Hazzit, 2008 ; Sakkas et Papadopoulou, 2017 ; Figueredo, 2007**).

Le genre Origan se compose de 43 espèces et 18 hybrides disposés en trois groupes et 10 sections (**Krishnakumar et Potty., 2012**). Ce genre comprend plusieurs espèces, des sous espèces, des variétés et des hybrides qui peuvent être individuellement distingués, mais il existe encore de grandes variations (**Amar et El Wahab., 2013**).

Les plus importantes espèces d'*Origanum* du monde sont: *Origanum majorana* L. (la marjolaine douce), d'*O. vulgare* (origan sauvage de Turquie), l'*O. dictamnus* L.(Dittany de Crète), *Origanum onites* L.(origan italien ou marjolaine en pot), *O. heracleoticum* L. (origan grec ou marjolaine) et l'*O. syriacum* (l'hysope bible ou l'origan syrien) (**Krishnakumar et Potty., 2012**).

L'origan est généralement considéré comme une forme sauvage de la marjolaine (**Bekhechi et al., 2008**). Les espèces d'origan ont été utilisées depuis l'Antiquité comme remède traditionnel pour traiter diverses affections telles que la coqueluche et la toux convulsive, les troubles digestifs, les conditions spasmodiques,... (**Vazirian et al., 2015**). En raison de leur contenu en huiles essentielles qui se composent d'une quantité élevée de thymol et de carvacrol (**Şarer et al., 1982**), elles se caractérisent par des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antifongiques et antiparasitaires. (**Béjaoui et al., 2013**). De plus, ces plantes montrent de multiples bioactivités telles que des activités antivirales, anti-hépatotoxiques anti-ulcérogéniques et anti-hyperglycémique, antithrombine (**Chishti et al., 2013 ; Semiz et al., 2018**).

Les espèces d'*Origanum* sont largement utilisées dans l'agroalimentaire, l'industrie cosmétique et pharmaceutique comme l'une des herbes culinaires les plus connues dans le

monde, des agents aromatisants pour les produits alimentaires, boissons alcoolisées et parfumerie pour leur parfum épicé (**Şahin et al., 2004**). Les herbes séchées d'origan sont utilisées dans de nombreux aliments transformés tels que les produits laitiers, les produits carnés,... et certaines de ses espèces sont également utilisées comme un composant de parfum dans les savons, les parfums, les cosmétiques, les détergents, les arômes et les produits pharmaceutiques (**Béjaoui et al., 2013**).

L'Origanum est utilisée en Algérie comme remède contre les affections respiratoires et la toux. Effectivement, c'est une plante expectorante, stomachique, tonique, stimulante, qui possède des propriétés, antispasmodiques et antiseptiques (**Bekhechi et al., 2008**).

2.2. Description botanique du genre

L'Origanum est une plante herbacée vivace (**Aiboud, 2012**), et arbustive (**Aligiannis et al., 2001**) de 30 à 90cm de haut, leurs tiges sont carrées basses ligneuses et persistantes, dressées portant des branches latérales sur le quart ou la moitié supérieure de longueur variable de 10 à 60 cm, à des petites feuilles simples, ovales, vert foncé, opposées et espacées possèdent des glandes sécrétrices sessiles ou pédonculées sur leur surface, ces glandes sécrétrices sont aussi présentes sur tiges, bractées, calices et corolles. Les inflorescences sont en épis, elles-mêmes réunies en inflorescences composées (**Chikhoun, 2007**) portées par chacune des tiges et chacune des branches, les bractées sont arrondies, ovales ou lancéolées petites ressemblent à des feuilles, ou grandes fines souvent de couleur jaune-vert (**Figueredo, 2007**). Les fleurs blanches ou roses sont groupées en inflorescences, et sont situées dans l'aisselle d'une bractée ovale, et dépassant le calice. Ce calice est la partie la plus variable dans *L'Origanum* qui est tubuleux à cinq dents courtes soudées bilabié ou non formé par une ou 2 lèvres plus ou moins dentées et soudées. La corolle est blanche, rose ou bien pourpre, en forme de tube est dressée avec 2 lèvres. Les fruits sont constitués d'akènes bruns, ovoïdes (**Bouhadouda, 2016 ; Mahfouf, 2018**).

2.3. Répartition géographique

L'Origan était l'une des plantes majeures de l'antiquité, qui est connu largement dans le monde des herbes pour ses huiles volatiles (**Sari, 2018**). La plupart des espèces d'origan sont aromatiques (**Vasudeva et Goel., 2015**) et sont principalement distribués dans les régions Méditerranéenne, Euro sibérienne et Irano Sibérienne (figure.1). Plus de 75% des espèces sont

répandues dans les régions méditerranéenne de l'Est (**Şahin et al., 2004**). La majorité des espèces se trouvent dans de petites zones, 70% sont endémiques à un pays ou à une montagne, par exemple : *O. saccatum*, *O. hypericifolium*, *O. acutidens*, *O. sipyleum*, *O. brevidens*, *O. haussknechtii*, etc... Ces espèces sont particulières à la Turquie, pays qui est considéré comme le centre génique du genre *Origanum* puisqu'il en possède 16 espèces. Seulement quelques espèces existent dans la partie occidentale de la Méditerranée (**Ietswaart, 1980; Figueredo, 2007**).

Le genre *Origanum* est largement présent dans des îles Canaries et des Açores, en Europe du Nord jusqu'à l'Est de l'Asie (**Figueredo, 2007**).

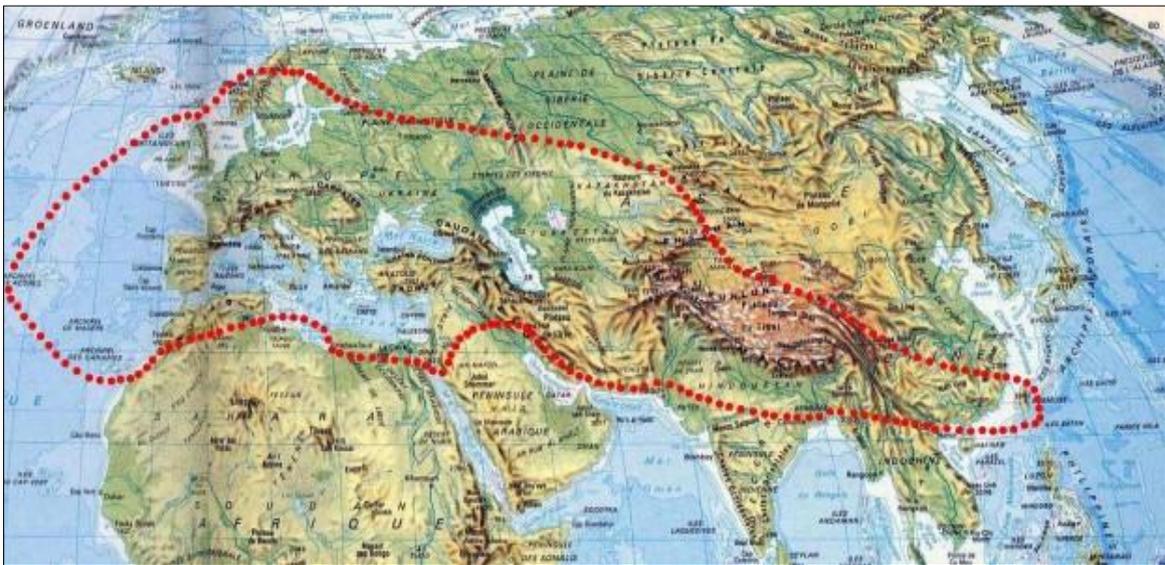


Figure 1. Aire de répartition du genre *Origanum* (**Figueredo, 2007**)

2.4. Distribution géographique du genre *Origanum* en Algérie

Le genre *Origanum* est une plante répandue en Algérie et représentée par trois espèces spontanée phylogénétiquement proche: *Origanum majorana* L., *Origanum glandulosum* Desf. et *Origanum floribundum* Munby (**Chikhoun, 2007 ; Daoudi-Merbah, 2013**).

- *L'Origanum majorana* L.: est distribué en l'Europe et la Méditerranée.
- *L'Origanum vulgare* ssp *glandulosum* Desf : est plus répandue dans toutes les régions et sur le plan phytogéographique, commune dans tout le Tell et elle est considérée

comme une plante endémique dans l'Algéro-Tunisien, elle pousse dans les broussailles et garrigues.

➤ *L'Origanum floribundum* Munby : est une espèce rare, endémique algérienne localisée dans l'Atlas Tellien et la grande Kabylie où pousse dans les pâturages surtout en montagne (Sari, 2018; Chikhoun, 2007; Daoudi-Merbah, 2013)

2.5. Exigences écologiques et culture d'*Origanum*

Le genre *Origanum* pousse à l'état sauvage dans le bassin méditerranéen (Vasudeva et Goel., 2015). Les espèces d'*Origanum* habitent énormément les régions de montagnes rocheuses à une large gamme d'altitudes (0–4000 m) et les pentes caillouteuses (Şahin et al., 2004). Elles sont trouvées dans les endroits secs et chauds, les garrigues et les pâturages (Sari, 2018). L'origan est une plante vivace qui pousse de préférence sur les talus ensoleillés des pays du bassin méditerranéen (Chikhoun, 2007). *O. majorana* est cultivé dans les jardins, à l'extérieur ou en pots, comme herbe médicinale (Ietswaart, 1980).

2.6. Les composants primordiaux des huiles essentielles d'Origan

Les constituants chimiques de l'origan sont utilisés pour la classification des espèces du genre *Origanum* (Sari, 2018). Les composants, la qualité et le rendement de l'huile essentielle extraite des espèces *Origanum* montrent une grande variation selon la génétique de la plante, le stade végétatif, les procédés d'extraction et notamment les constituants de l'environnement et l'habitude de la plante (Chikhoun, 2007). D'après les études réalisées sur la composition des huiles essentielles de diverses espèces d'*Origanum*, deux chémotypes sont rapportés : un type riche en terpinène-4-ol/sabinène hydraté et un type avec du thymol et/ou carvacrol comme composés prédominants (Soliman et al., 2009) suivis de γ -terpinène, du p-cymène, du linalool, du terpinen-4-ol et de l'hydrate de sabinène (Amar et al., 2013).

Généralement, ces huiles volatiles d'origan sont riches en monoterpènes phénoliques comme le carvacrol qui est le principal composé (35 à 74%), et dans certains cas le thymol, de plus autres composés en quantité moins importante comme les monoterpènes acycliques tel que linalool, β -myrcène, acétate de géranyl, géraniol, acétate linalylique... et des composés bornanes comme le camphène, camphre et bornéol. En plus, quelques sesquiterpènes sont présents tels que : caryophyllène, germacrene-D, γ -cadinène, bisabolène, oxyde de caryophyllène, α -cadinol, ect... (Sari, 2018; Chikhoun, 2007).

Parmi les espèces du genre *Origanum*, certaines plantes considérées comme étant les plus aromatiques dans le monde végétal, par exemple la marjolaine (*Origanum majorana* L.) (Chenna et al., 2018).

3. *Origanum majorana* L

L'*Origanum majorana* est une plante cosmopolite vastement nommé " Marjoram " (Deuschle et al., 2018) ou marjolaine vraie, anciennement connue par le nom *Majorana hortensis* Moench (figure.2). Elle est communément appelée « marjolaine douce » en raison de leurs saveurs d'agrumes. Elle est appelée vulgairement Merdgouche. Elle est généralement connue sous d'autres noms : *Sweet Marjoram*, marjolaine à coquilles, Marjolaine française. En Afrique du Nord les Arabes l'appellent : Khezama (Tunisie), Meurdekouch (Maroc), Mardguscia (Tripojjiaine), et parfois Mazerouch ou Marikoum, noms données aussi à d'autres espèces d'*Origanum* (Chevalier.1938 ; Soliman et al., 2009 ; Semiz et al., 2018).



Figure 2. *Origanum majorana* (photo original)

3.1. Description botanique

Origanum majorana L est un sous-arbuste vivace et herbacé sauvage et annuel cultivé comme plante aromatiques (Vera et al., 1999). Il atteint environ 30 à 60 cm et se caractérise par une tige rougeâtre quadrangulaire, dressée, ramifiée et faible de 80 cm de long; des racines pivotantes sub-cylindriques de 0,2mm jusqu'à 1cm de diamètre; des feuilles simples, ovales et lisses due à la présence de nombreux poils, de couleur gris vert mesurent 0,5-1,5 cm de long et 0,2-0,8 cm de large, plus ou moins pétiolées et arrangées par paire en face à face sur le tige; des petites fleurs tubulaires hermaphrodite à deux lèvres blanches ou rosées groupées en épis dans l'aisselle des feuilles supérieures ; un calice bilabié à deux lèvres orbiculaires ; inflorescence en epis de globuleux très denses; et les graines sont petites ovales et brunes foncée; la Corolle à 2 lèvres de (3-7) mm longue; les étamines peu saillant filaments jusqu'à 5 mm de long (figure.3). (Vasudeva et Goel., 2015; Ietswaart, 1980; Iserin, 2001; Chenna et al., 2018).

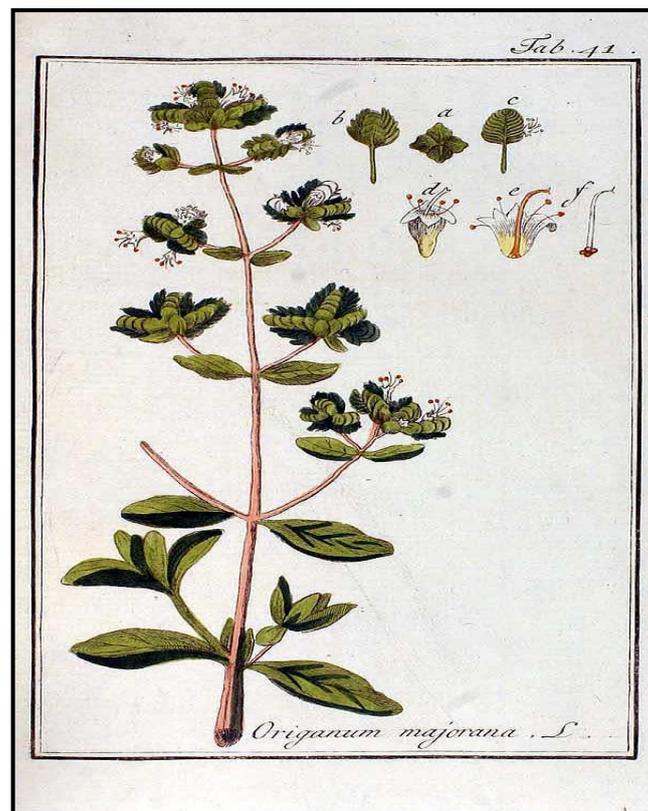


Figure 3. Aspect morphologique d'*Origanum majorana* (Oskamp, 1796)

a : calice, b : corolle, c : fleur, d : gynécée, e : étamine, f : style

3.2. Classification de l'*Origanum majorana* L. (Tripathy et al., 2017)

Règne: Plantae

Sous- règne: Viridiplantae

Super division: Embryophyta

Division: Trachéophyta

Sous-division: Spermatophytina

Classe: Magnoliopsida

Super-ordre: Asteridae

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae

Sous-famille: Nepetoideae

Genre: *Origanum* L.

Espèce: *Origanum majorana* L.

3.3. Habitat et culture

Originaire du bassin méditerranéen (**Iserin, 2001**), de Chypre et du sud de la Turquie (**Ietswaart et al., 1980**), la marjolaine vraie est une plante vivace sur les côtes de la région méditerranéenne et en Afrique, mais annuelle dans les jardins de l'Europe centrale où elle est cultivée (**Chevalier, 1938**).

L'*origanum majorana* est une plante aromatique cultivée partout dans le monde dans divers parties de l'Inde, la France, en Europe du nord et dans les zones tropicales comme un aromate et pour sa saveur, son huile essentielle et son parfum (**Iserin, 2001; Vasudeva et Goel., 2015**). Elle pousse en Europe du Sud, en Afrique du Nord et en Turquie (**Soliman, 2009**).

L'*Origanum majorana* est cultivée également dans de nombreux pays, d'Amérique et l'Asie, en Europe occidentale et se retrouve sous-spontanément dans ses habitats originaires, elle pousse généralement dans des régions secs rocheux et calcaires de 100 à 1500m d'altitude, et cultivé comme herbe médicinale dans les jardins, en pots ou à l'extérieur

(Ietswaart et al., 1980). Elle demande un sol limoneux fertile, chaud, bien drainé et un arrosage fréquent, elle tolère des sols acides, neutres et des sols basiques. De plus, elle a besoin d'environ plein soleil et peut être cultivé à des endroits sans ombre ou mi-ombre.

Elle se multiplie par graines et par bouture. C'est un arbuste sensible au froid, vivace dans un climat plus chaud, bien que dans des conditions climatiques tempérées est une plante annuelle (Nurzyńska-Wierdak et al., 2015 ; Vasudeva et Goel., 2015).

La teneur en huile essentielle de leurs feuilles est optimale quand la plante est récoltée avant la formation des graines. Les graines mûrissent d'août à septembre (Vasudeva et Goel., 2015) et elle fleurit de mai à septembre où la plante est récoltée pendant cette période (Nurzyńska-Wierdak et al., 2015 ; Ietswaart et al., 1980).

Généralement, les parties de la plante utilisées sont les parties aériennes et l'huile essentielle (Iserin, 2001).

3.4. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* L

L'*O. majorana* se caractérise par de fortes saveurs et odeurs agréables et épicées. En particulier, cette herbe contient jusqu'à 3% d'huile volatile et comme principaux constituants, en raison de sa nature aromatique (comprenant de l'hydrate de sabinène, du carvacrol, du linalol et autres triperpènes), les acides caféique et rosmarinique, les flavonoïdes, et les composés triterpéniques tels que l'acide oléanolique et acide ursolique, des stéroïdes (par exemple, le β -sitostérol), des terpénoïdes phénoliques, des glycosides phénoliques, des tanins, et des sitostérols. Elle contient aussi du sabinol, α -terpinène, terpinène-4-ol, thujanol, camphre, pinène, eugénol (Iserin, 2001; Deshmane et al., 2007; El Ashmawy et al., 2007; Vasudeva et Goel., 2015).

Différents tests phytochimiques ont signalé une présence des terpénoïdes, des tanins et des flavonoïdes dans des extraits d'éthanol, tandis que les glucides et des saponines étaient présents dans des extraits aqueux de racine et tige d'*Origanum majorana* (Vasudeva et Goel., 2015).

En raison de la différence dans les emplacements des échantillons, il peut y avoir des différences de composition de l'huile essentielle. La littérature a montré que les constituants phytochimiques de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* sont du terpinène-4-ol et du cis-sabinène, qui sont responsables de leur saveur et de l'arôme caractéristiques. Les composés

majoritaires sont: les terpinolènes (α -terpinolène et γ -terpinolène), le thymol et le carvacrol. Autres métabolites secondaires : le rosmarinat de méthyle, l'apigénine et la lutéoline-7-O-rutinoise (Deuschle et al., 2018).

La composition de l'huile essentielle de la marjolaine est exprimée en pourcentage de différents composés des familles des monoterpènes, des monoterpénols des sesquiterpènes et des esters terpéniques (figure.4). (Kahouli, 2010):

-les monoterpènes: γ -terpinène (12.60%), α -terpinène (7.73%), sabinène (7.65%), terpinolène (2.92%), β -phellandrène (1.90%), limonène (1.76%), p-cymène (1.57%), α -pinène (0.77%), α -thujène (0.77%), alphaphellandrène (0.56%). β -pinène (0.43%).

-Les monoterpénols: terpinén-4-ol (22.85%), (E)-hydrate de sabinène (15.94%), α -terpinéol (4.88%), (Z)-hydrate de sabinène (4.40%), (Z)-paramenth-2-ène-1-ol (1.98%), (E)-para-menth-2-ène-1-ol (1.25%).

-les sesquiterpènes : β -caryophyllène (2.49%), bicyclogermacrène (1.22%).

-les esters terpéniques : acétate de linalyle (1.70%).

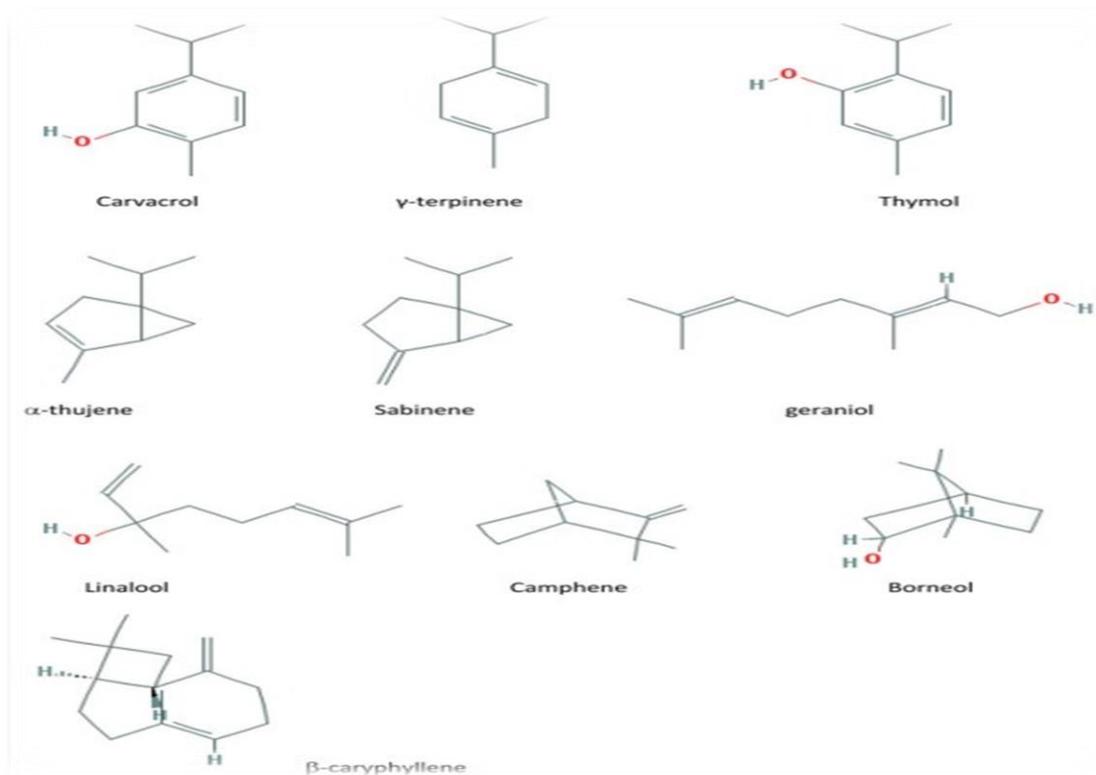


Figure 4. Structure de certains des principaux composés actifs d'*Origanum majorana* (Bina et al., 2017)

3.5. Les éléments présents dans l'*Origanum majorana* :

L'analyse nutritionnelle des feuilles séchées pour 100 g est présentée dans le tableau I ci dessous.

Tableau I. Eléments nutritionnels présents dans l'*O. majorana* (Tripathy et al., 2017).

Les denrées alimentaires et les microéléments	Les valeurs nutritionnelles pour 100g d'origan
Energie	271 cal
Glucides	60,56 g
matières grasses totales	7,04 g
cholestérol	0 mg
fibres alimentaires	40,3 g
Les Vitamines	
folate (vitamine B)	274 µg
niacine	0,902 mg,
acide pantothénique	0,209 mg,
pyridoxine	1,190 mg
riboflavine	0,316 mg
Thiamine	0,289 mg
vitamine A	8058 UI
vitamine C	51,4 mg
vitamine E	1,69 mg
vitamine K	621,7 µg
Les Électrolytes	
sodium	77 mg
potassium;	1522 mg
Les Minéraux	
calcium	1990 mg
cuivre	1,133 mg
fer	82,71 mg
magnésium,	346 mg
manganèse	5,433 mg
zinc	3,60 mg
Les Phytonutriments	
carotène-β	4806 µg
cryptoxanthine-β	70 µg
lutéine-zéaxanthine	1895 µg.

3.6. Usages et propriétés médicinales de *Origanum majorana*

Origanum majorana L. est utilisée beaucoup dans la médecine traditionnelle aussi bien que dans l'industrie cosmétiques (Deshmane et al., 2007). C'est une épice populaire utilisée depuis des siècles comme remède à de nombreuses maladies et en cuisine (Gramza-Michalowska et al., 2008). Elle contribue à de multiples activités bénéfiques pour la santé. C'est un remède à la maison, il est apprécié pour les maladies cardiovasculaires, les infections pulmonaires, les maux de gorge, les troubles nerveux, l'insomnie, la nervosité et pour les soins de la peau. Traditionnellement, les feuilles de marjolaine sont utilisées pour soigner le diabète et le catarrhe (Vasudeva et Goel., 2015).

La marjolaine vraie possède des vertus toniques générales, diaphorétiques, diurétiques et expectorantes (Deshmane et al., 2007) et est utilisé comme médicament antiasthmatique et antiparalytique, spasmolytique et comme un antirhumatique. Elle est utilisée pour traiter le cancer, (Chishti et al., 2013) l'asthme, les vertiges et les rhumatismes (Waller et al., 2016).

L'*origanum majorana* possède des propriétés stimulantes et antispasmodiques, sédatives et peut être utilisée comme antidote en applications locales pour inactiver le venin de serpents (Guerra-Boone et al., 2015). Elle est connue pour ses propriétés antiseptique (Tripathy et al., 2017) et anticoagulantes (Deuschle et al., 2018).

La marjolaine officinale a une action très puissante sur le système nerveux, fortifiant, elle soulage les flatulences, les coliques et les problèmes respiratoires, elle expulse les sécrétions inflammatoires et diminue les douleurs dentaires (Iserin, 2001).

L'*Origanum majorana* est utilisée contre les crampes, les troubles digestifs, les maux de tête, la dépression, elle a été utilisée aussi pour traiter le rhume et la rhinite (Soliman et al., 2009).

L'huile essentielle d'*Origanum majorana* L. a montré des propriétés antimicrobiennes, antibactériennes antifongiques et antivirales, des effets antiprolifératif et anti-inflammatoires, antioxydants attribuée à sa quantité élevée en acides phénoliques, et en flavonoïdes utilisant pour la conservation des aliments (Chishti et al., 2013 ; Deshmane et al., 2007 ; Waller et al., 2016). Ces huiles essentielles sont utilisées à l'extérieur pour les douleurs musculaires et l'arthrite et la congestion thoracique. Elle peut être préparée en infusion, en bain de bouche pour l'hygiène buccale, et comme cataplasme (Soliman et al., 2009).

Une infusion d'*Origanum majorana* L. est utilisée comme stimulant, sudorifique, emménagogue et galactagogue et encore utile dans l'asthme, l'hystérie et la paralysie (Moussaid et al., 2012). Les feuilles fraîches ou séchées et leur huile essentielle sont utilisées beaucoup dans l'industrie alimentaire, dans la fabrication des aliments comme ingrédient alimentaire, tisane, conservateurs nutritionnels et naturel, arôme et colorant (Badee et al., 2013). C'est une herbe de cuisine qui s'emploie pour aromatiser de nombreuses préparations culinaires, comme l'assaisonnement dans les salades, les sauces, condiments, les soupes, les viandes, les poissons, les conserves, les liqueurs, les vermouths et les amers et autres produits. Ses feuilles sont utilisées pour faire du thé (Chishti et al., 2013; Tripathy et al., 2017) et ses huiles sont utilisées pour parfumer les savons, les parfums et les lotions et comme un ingrédient des onguents et dans les détergents. Elle était utilisée aussi pour conserver et désinfecter les aliments (Deuschle et al., 2018 ; Vasudeva et Goel., 2015 ; Soliman et al., 2009 ; Badee et al., 2013).

De plus, les huiles essentielles d'origan contiennent des composés hautement bioactifs qui ont des effets acaricides et insecticides, ainsi que des effets antibactériens prometteurs contre les bactéries d'origine alimentaire et d'altération des aliments (Sakkas et Papadopoulou., 2017).

Les utilisations ethnomédicinales de la marjolaine douce dans différents pays sont présentées dans le tableau II.

Tableau II. Utilisations ethnomédicinales d'*O. majorana* (Bina et al., 2017)

Région	Partie végétale utilisée	Utilisations traditionnelles
Iran (Bina et al., 2017)	Feuilles	-Antimicrobien, antiseptique, antidote, carminatif, antitussif, -utilisé pour les troubles gastro-intestinaux, tête froide, reniflement, pour la performance visuelle, otite, -céphalée, épilepsie, mélancolie accompagnée de flatulences, paralysie faciale unilatérale, douleur auriculaire, mal de dos, spondilolysthésis. -fatigue, migraine, tache de rousseur, dyspnée, douleur cardiaque, dysrythmie, crampe, obstruction du gros intestin, emménagogue, strangure, hydropisie.

Azerbaïdjan (Alakbarov, 2003)	Huile essentielle	diurétique, sédatif, contre les flatulences et la nervosité.
Angleterre (Bina et al., 2017.)	Feuilles	Rhume, toux bronchique, coqueluche asthmatique
Egypte (Bina et al., 2017.)	Feuilles	Froid, frissons.
Inde (Bina et al., 2017)	Huile essentielle	Maux de dents, apaise les articulations, douleurs musculaires.
Turquie (Erenler et al., 2016)	Huile essentielle	Asthme, indigestion, maux de tête, rhumatismes.
Maroc (Tahraoui et al., 2017)	Feuilles	Hypertension.

3.7. Activités pharmacologiques d'*Origanum majorana*

Activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'HE de marjolaine et de sa substance purifiée a été rapportée par **Vagi et al., 2005**. L'huile essentielle et l'extrait aqueux, l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne d'*O. majorana* présentent une activité antioxydante importante. Des propriétés antioxydantes ont également été signalées à partir d'autres extraits de marjolaine douce, y compris l'éthanol, le n-hexanène et l'extrait hydroalcoolique. Cette activité antioxydante est attribuée aux composés phénoliques tels que l'acide hydroxycinnamique et les flavonoïdes, l'acide ursolique, l'acide carnosique, le carnosol, l'acide rosmarinique et l'acide caféique (**Bina et al., 2017**).

Activité antibactérienne

Bien que les propriétés antibactériennes et antifongiques de l'huile essentielle de marjolaine soient bien connues, son huile volatile possède des propriétés antimicrobiennes contre les bactéries d'origine alimentaire et les champignons mycotoxigènes (**Vagi et al., 2005**). Les huiles essentielles de l'*Origanum majorana* dérivées des feuilles ont montré un effet antibactérien sur diverses bactéries à savoir : *Bacillus cereus*, *E.coli*, *Staphylococcus coagulase*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Acinetobacter spp.*, avec le test de diffusion sur gélose et en utilisant *S. aureus*, *E.coli*, *K.pneumoniae* et *Pseudomonas spp.*

L'extrait à l'éthanol et à l'eau d'*O. majorana L.* a montré une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positives et Gram négatives et ses applications alimentaires possibles par estimation de la concentration minimale d'inhibition. L'extrait d'éthanol avait un effet inhibiteur élevé contre les bactéries comparable à l'extrait aqueux (Tripathy et al., 2017).

Activité antifongique

Les huiles essentielles des feuilles d'*O. majorana* ont montré une activité antifongique contre *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*, en observant leur croissance et/ou l'inhibition des mycéliums par rapport au standard (sans huile). Divers extraits de feuilles à l'hexène aqueux, des extraits d'éthanol et d'éthanol-ammoniac ont montré un effet antifongique in vitro contre six *Candida* spp. souches de levure (Tripathy et al., 2017).

Antiseptique et Antidote

Les antiseptiques sont des substances antimicrobiennes qui sont appliquées sur les tissus vivants/la peau pour réduire le risque d'infection, de septicémie ou de putréfaction. Dans l'Antiquité, Hippocrate a introduit l'activité antiseptique de la marjolaine car elle contient de nombreux constituants phénoliques qui agissent contre les infections microbiennes. Les composés comme le terpinène-4-ol, l'hydrate de cis-sabinène, le p-cymène et l' α -terpinéol, le carvacrol et le thymol (phénols) sont des constituants éminents qui peuvent être responsables de l'activité antiseptique. Aristote a rapporté que les tortues qui mangeaient un serpent immédiatement devaient manger de l'origan pour ne pas mourir, ainsi l'origan est également pris par les hommes comme anti-poison (Tripathy et al., 2017).

Anti-anxiété

L'extrait de feuilles a montré des effets anti-anxiété sur des rats dans un modèle de labyrinthe ouvert à une dose intrapéritonéale de 200mg/kg pc. Les effets étaient dose-dépendants et comparables au diazépam (Tripathy et al., 2017).

Activité antiulcéreuse

L'huile volatile hydrodistillée et l'extrait de méthanol des feuilles ont montré des propriétés de guérison des ulcères chez les rats diabétiques induits par la streptozocine-

nicotinamide à trois doses différentes (100, 200 et 400mg/kg,po), l'effet était dose-dépendant et plus efficace que le glibenclamide et comparable à la ranitidine (**Vasudeva et Goel., 2015**).

Activité antiprotozoaire

L'huile volatile de feuilles de l'*Origanum majorana* a montré un effet antiprotozoaire in vitro contre une seule espèce de protozoaire pentatrichomonas hominis par la méthode de diffusion sur disque (**Vasudeva et Goel., 2015**).

Activité antidiabétique

L'extrait au méthanol des feuilles a montré une activité antidiabétique chez les souris induites par la streptozotocine par divers tests in vitro et in vivo. L'*Origanum majorana* a montré des effets significatifs sur l'inhibition in vitro de la formation avancée du produit final de glycation. L'effet était plus important que l'agent antiglycation standard, l'aminoguanidine (**Tripathy et al., 2017**).

Activité antimutagène

L'extrait à l'éthanol des parties aériennes de la marjolaine a montré un effet antimutagène contre la mutation induite par le cyclophosphamide chez la souris à la dose efficace minimale de 125 mg/kg. L'effet de l'extrait de marjolaine s'est avéré protéger toute modification des teneurs en ARN, ADN et protéines dans le foie et les testicules des souris par rapport au témoin (**Vasudeva et Goel., 2015**).

Activité analgésique, anti-inflammatoire et antispasmodique

Les effets des extraits de méthanol d'*Origanum majorana* sur l'activité antiagrégante plaquettaire humaine, qui est liée au mécanisme d'action bien connu des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) par inhibition de la voie métabolique des prostaglandines, ont été étudié par Okazaki et al. (1998). Ils ont découvert que les extraits d'*Origanum majorana* inhibaient en fonction de la dose l'agrégation plaquettaire induite par le collagène (2,0 µg / ml) ou l'ADP (2,0 µg / ml) (**Tripathy et al., 2017**).

Activité immunostimulant

Une augmentation des taux d'immunoglobulines (IgG) a été observée chez les veaux élevés, nourris avec un concentré conventionnel complété par un mélange minéral-végétal contenant *Origanum majorana* et ses extraits aqueux ont également pu supprimer la mutagénicité du carcinogène hépatique (**Tripathy et al., 2017**).

Activité antiparasitaire

Une activité antiparasitaire efficace a également été observée lorsque de l'huile essentielle d'*O. majorana* a été pulvérisée sur des abeilles dans des colonies infestées de *V. jacobsoni* à une concentration (100 ppm), qui s'est avérée non toxique pour les abeilles (Fathy et Fouly, 1997). L'huile essentielle d'*O. majorana* s'est avérée être un puissant agent acaricide contre *Acarapis woodi* (Renie), le parasite causant la maladie des acariens qui envahit le système trachéal des abeilles pendant l'hiver et au début du printemps. Le pourcentage d'infestation dans les colonies d'abeilles, traitées à l'huile essentielle d'*O. majorana* (10 gouttes d'huile par morceau de coton dans une boîte de Pétri, qui a été mis sous les rayons des colonies infestées) a été considérablement réduit déjà après 15 jours de traitement, et après 30 jours de traitement, aucune infestation n'a été trouvée parmi les abeilles testées (**Tripathy et al., 2017**).

Toxicité d'*Origanum majorana*

Le test de toxicité aiguë de l'extrait d'*Origanum majorana* chez la souris a montré une marge de sécurité significative. L'huile essentielle d'*O. majorana* ne doit pas être utilisée par les femmes allaitantes et enceintes (**Bina et al., 2017**).

II. Travaux antérieurs

De nombreux travaux ont été effectués sur les huiles essentielles de l'origan pour connaître la composition chimique, l'effet antibactérien et l'activité antioxydante de ses huiles. Nous présentons ci-après certains travaux relatifs à l'*O. majorana*.

1. Rendement en HE d'*Origanum majorana* dans différents pays

Le rendement en huile essentielle d'*Origanum majorana* dans différentes régions est illustré dans le tableau III.

Tableau III. Rendements d'HE d'*Origanum majorana* dans différents pays.

Pays	Période de récolte	Méthode	Rendement (%)	Référence
Algérie (Ben Allel)	Février	Hydrodistillation	0.65	Abd el Mallek et Yagoubi., 2017
	Mars		2.1	
	Avril		2.25	
Algérie (El Oued) 1	-	Hydrodistillation	0.61	Chenna et al., 2018
Algérie (El Oued) 2	-	Hydrodistillation	2.36	Bernaoui et Louetri., 2018
Turquie	-	Distillation à la vapeur	1.86	Semiz et al., 2018
Andes vénézuéliennes	-	Hydrodistillation	0.6	Ramos et al., 2011
Égypte	hiver	Hydrodistillation	2,8	Soliman et al., 2009
	printemps		3	
	été		2.5	
	automne		2.5	
Maroc	-	Hydrodistillation	2.50	Lakhrissi et al., 2016
Tunisie	Juin	Hydrodistillation	1.85	Hajlaoui et al., 2016
Québec	-	hydrodistillation	0.66	Kahouli, 2010

Le rendement de l'HE d'*O. majorana* d'Algérie est compris entre (0,61-2,36%), la quantité d'HE était remarquable pour la région d'El Oued 2 (2,36%) par rapport aux autres régions (**Bernaoui et Louetri., 2018**). Le rendement le plus élevé entre ces pays est enregistré en Egypte durant le printemps (3%) et le rendement le plus faible est celui enregistré dans les Andes vénézuéliennes (0,6%). Cette différence de rendement est due principalement à l'influence de plusieurs facteurs : les facteurs écologiques surtout climatique, la température, l'humidité, l'espèce végétal elle-même l'organe végétal, le stade de croissance, la période de récolte, la conservation de matériel végétale et la méthode d'extraction (**Lamamra, 2018**).

2. Caractérisation organoleptique et propriétés physico-chimiques des huiles essentielles d'*Origanum majorana* dans le monde

Les différentes caractéristiques des HEs d'*O.majorana* sont présentées dans le tableau IV.

Tableau IV. Caractéristiques des huiles essentielles *d'Origanum majorana*.

Région	Caractéristiques							Références
	Période de récolte	Aspect	Couleur de l'H.E	Odeur	Goût	pH	densité	
El Oued- Algérie 1	-	-	Jaune très claire	Aromatique	Amer piquant	4,25	0,66	Chenna et al., 2018
El- Oued- Algérie 2	Juillet	liquide mobile	Blanchâtre	caractéristique	-	5.75	0.95	Bernaoui et Louetri., 2018
Algérie (Ben Allel)	Février	Liquide limpide	Jaune claire	Douce	-	6	1.0026	Ahmed Abd el Malek et Yagoubi., 2017
	Mars						1.049	
	Avril						1.050	
Maroc	-	Liquide limpide	Jaune pâle à foncé	Douce, fine chaude et délicat	-	-	-	Lakhrissi et al., 2016
Québec	-	liquide mobile limpide	jaune pâle à foncée	douce, fine, chaude, épicée.	-	-	-	Kahouli, 2010
Égypte	hiver	-	jaune pâle	caractéristique	-	-	-	Soliman et al., 2009
	printemps							
	Eté							
	Automne							

Ces résultats montrent que les HES d'*O. majorana* sont caractérisées par le même aspect liquide limpide en Algérie et au Maroc ; une couleur différente entre les HES des divers pays : du jaune claire ou incolore à jaune foncé ; une odeur douce, chaude et aromatique et un goût amer piquant ; le pH de l'HE est acide et varie de 4.25 à 6. La densité de cette HE est variable de 0.66 à 1,050.

3. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum majorana*:

3.1. *Origanum majorana* d'Algérie

L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplée à spectrométrie de masse (GC/MS) de l'huile essentielle d'*Origanum majorana*, collectée de la région de Ben Allal (W. Ain Defla), a montré que les principaux constituants de cette HE sont : 4-Terpinéol (13.9%), Terpinolène (9.4%), α -Terpinène (8.8%), Sabinène (5.1%) et γ -Terpinène (4.8%) (**Ahmed abd el Malek et Yagoubi., 2017**).

L'examen du profil chromatographique par GC-FID de l'huile essentielle d'*O. majorana* L. d'El Oued (Algérie), a fait dévoiler 15 constituants dont les molécules identifiées sont : bornéol (15,50 %), Eucalyptol (11.33%), α -terpinène (2.6%) et 3-carène (1.77%) (**Chenna et al., 2018**).

L'analyse par GC/SM de l'HE d'*O. majorana* récoltée au mois de juillet à El-Oued a révélé que les principaux composés présentés dans l'huile sont : Naphthalene, 1,1'-(1,10-decanediyl)bis(22,22%), Cyclopentanecarboxylic acid, 3-methylene (10.74%), Silane, allyl(bornyloxy)methylphenyl (10,00%),(-)-Caryophyllene-(I1)(7,27%), alpha.-phellandrene (1.80%), Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro(5,34%),Naphthalene, 1,1'-(1,10-decanediyl)bis[d(3,43%), et Naphthalene, 1,1'-(1,2-ethanediyl)bis de (3,02%) (**Bernaoui et Louetri., 2018**).

D'après ces études, nous remarquons que la composition chimique de l'huile essentielle de la même plante (*O. majorana*) d'Algérie est différente d'une région à une autre. Dans la région d'El Oued le bornéol (15.50%) est le composé majoritaire (Chenna et al., 2018), tandis que Bernaoui et al., (2018) ont montré que le composé majoritaire est Naphthalene, 1,1'-(1,10-decanediyl) bis (22,22%), cependant dans la région de Ben Allal le 4-terpinéol (13.94%) était le composé majoritaire.

3.2. *Origanum majorana* de Maroc

L'analyse chromatographique des HE d'*O. majorana* du Maroc a permis d'identifier 13 constituants représentant environ 77% de l'HE. En effet, les composés majoritaires obtenus sont: trans-Sabinène hydrate (26,64%), Terpinèn-4-ol (17,08%) et O-Cymène (6,29%) (**El Idriss, 2014**). Tandis que selon un autre travail au Maroc, les principaux constituants de l'*O. majorana* obtenues par distillation à la vapeur étaient le linalol (32,68%) et le terpinène-4-ol (32,30%) (**Charai et al., 1996**).

3.3. *Origanum majorana* de Tunisie

Les résultats de l'analyse des constituants volatils de l'HE d'*O. majorana* Tunisien ont révélé la présence de 24 constituants. Les principaux composants étaient le terpinen-4-ol (23,2%), l'hydrate de cis-sabinène (17,5%), le α -terpinène (10,5%), p-cymène (9%), l' α -terpineol (5,6%), α -terpinène (4,7%) et l'hydrate de trans-sabinène (4,0%) (**Hajlaoui et al., 2016**).

3.4. Composition chimique de l'HE d'*Origanum majorana* dans divers pays du monde

La composition de l'HE d'*O. majorana* a été largement étudiée dans différents pays à travers le monde. Les principaux composants de l'HE sont présentés dans le tableau V.

Tableau V. Les principaux constituants de l'HE d'*O. majorana* de divers pays.

Constituants	Teneur (%)						
	Turquie	Egypte	Iran	Venezuela	Brésil	Colombie	Canada
Linalool	38.38	4	/	3,8	4.4	1.0	2.31
thymol	26.11	31	13.54	/	/	10.0	/
γ -terpinene	11.63	13	3.11	7,2	8.5	14.0	/
p-Cymene	6.38	2	6.78	2.4	7.0	3.1	1.97
terpinen4-ol	2.98	31	/	28.8	20.4	6.0	38.3
cis-sabinene hydrate	/	16	/	30,2	/	2.6	1.1
α -terpinene	2.85	6	0.09	3.	4.6	5.2	12.5
Sabinene	0.21	6	/	1.4	6.7	4.3	0.69
carvacrol	/	/	57.86	/	/	3.7	/
trans-caryophyllène	0.84	/	11.52	0.6	/	1.0	/
α -terpinéol	/	3	/	6.9	4.7	1.8	6.9

trans-sabinene hydrate	/	4	/	4,4%	2.3	14.5	/
Références	Semiz et al., 2018	Sedlalík ová et al., 2017	Partovi et al., 2018	Ramos et al., 2011	Waller et al., 2016	Betancourt et al., 2012	Kahouli, 2010

Le profil chimique de l'huile essentielle d'*O. majorana* est différent entre les divers pays du monde. La composition de l'HE d'*O. majorana* collectée au sud de la Turquie a permis d'identifier plus de 97% des constituants. Les principaux composants sont : linalool (38.38%), thymol (26.11%), γ -terpinene (11.63%) et p-Cymene (6.38%) (Semiz et al., 2018). La composition chimique de l'HE de la marjolaine d'origine égyptienne a montré que le terpinen-4-ol (31%) était le principal composé, suivi du cis-sabinene hydrate (16%), γ -terpinene (13%), α -terpinene (6%) et sabinene (6%) (Sedlalíková et al., 2017). Tandis que dans l'huile essentielle d'*O. majorana* d'Iran, 17 constituants sont identifiés. Les composés majoritaires sont : carvacrol (57.86%), thymol (13.54%), trans-caryophyllène (11.52%) et p-cymene (6.78%) (Partovi et al., 2018). Selon les études de Ramos et al., (2011), les principaux constituants de l'HE d'*O. majorana* du Venezuela sont: l'hydrate de cis-sabinène (30,2%), terpinène-4-ol (28,8%), γ -terpinène (7,2%), α -terpinéol (6,9%), l'hydrate de trans-sabinène (4,4%), acétate de linalol (3,8%) et l' α -terpinène (3,6%). Une autre étude a montré que le composé majoritaire d'*O. majorana* de Colombie est le trans-sabinene hydrates (14.5%), suivi de γ -terpinene (14.0%), thymol (10.0%), terpinen 4-ol (6%) et carvacrol (3.7%) (Betancourt et al., 2012). Cependant, dans les huiles essentielles d'*O. majorana* acquis commercialement à São Paulo au Brésil, 22 composés ont été identifiés, le 1.8-cinéole était le principal composé (20.9%), suivie du 4-terpinéol (20.4%) et du γ -terpinene (8.5%), p-cymene (7.0%) et sabinene (6.7%) (Waller et al., 2016).

Une analyse par GC/MS et GC/FID de l'huile essentielle de la même plante, réalisée au Canada, a montré que les principaux composants de l'huile sont le terpinen-4-ol (38,3%), l' α -terpinène (12,5%), l' α -terpinéol (6,9%) et l'acétate de myrcénol à raison de 4,5%. De plus, l'hydrate-cis-sabinène (1,1%), du spathuléol (1,13%), du p-cis-menth-2-en-1-ol (1,62%), du p-cymène (1,97%), du linalool (2,31%), du terpinolène (2,88%), du β -phellandrène (2,18%) et de l' α -phellandrène (2,12%) (kahouli, 2010).

L'analyse de l'HE d'*O. majorana* collectée à Macapa au Brésil a montré que les principaux composants obtenus sont la pulégone (57,05%), des autres constituants verbénone (16,92%), trans-p-menthan-2-one (8.57%), iso-menthone (5.58%), pipéritone (2,83%), 3-octanol (2,35%) et isopulégol (1,47%) (Chaves et al., 2020).

Les différences de la composition chimique des HEs d'*Origanum* peuvent être liées à différentes conditions environnementales et climatiques, à la période de récolte, aux origines génétiques des plantes, des phases végétatives, des méthodes d'extraction et de quantification, des conditions de séchage et la partie de la plante analysée (Semiz et al., 2018; Hajlaoui et al., 2016).

4. Activité biologique de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* :

4.1. Activité antimicrobienne :

Selon l'étude de Charai et al., (1996) sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, la plante entière séchée et son extrait aqueux de feuilles d'*O. majorana* du Maroc par la détermination de la concentration minimale inhibitrice. Les résultats montrent que l'huile a inhibé totalement les bactéries lactiques et les levures et était plus active que l'extrait d'eau et la plante. Guerra-Boone et al., (2015) ont trouvé que l'huile d'*O. majorana*, cultivée dans le Nord-Est du Mexique, testée contre six souches fongiques et deux souches bactériennes qui provoquent des infections de la peau est hautement bioactive contre les dermatophytes testées, et légèrement active contre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes* qui étaient plus sensibles aux huiles que les bactéries examinées avec des valeurs minimales de concentration inhibitrice (CMI) variable entre 125 et 250 µg / mL. Deans et al., (1990) ont étudié *O. majorana* distillée à la vapeur pour évaluer les activités antibactériennes et antifongiques sur 25 bactéries et 5 espèces fongiques comprenant des bactéries d'intoxication alimentaire et des champignons et des agents pathogènes animaux et végétaux qui causent des mycotoxines. L'huile a exercé de grands pouvoirs inhibiteurs contre de nombreuses bactéries et *Staphylococcus aureus*, qui provoque une intoxication alimentaire, a été la moins affectée. Les organismes les plus sensibles sont *Beneckea natriegens*, *Erwinia carotovora* et *Moraxella sp.* Parmi les champignons testés, *Aspergillus niger* s'est révélé être le plus sensible à l'huile de marjolaine.

4.2. Activité antibactérienne :

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'origanum a fait l'objet de plusieurs recherches à raison de la composition chimique différente de ses huiles essentielles. L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* de la région d'El Oued (Algérie) par la méthode de puits sur six souches bactériennes (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *Salmonella enteric*, *Bacillus*

cereus), montrent que cette huile possède des activités antibactériennes importantes vis-à-vis de la plupart des souches testées avec des zones d'inhibition intéressantes. *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* étaient les souches les plus sensibles aux cette HE avec des zones d'inhibition de 15 mm. *E. coli* et *Klebsiella pneumonia* sont sensibles aux HEs pures et gentamicine avec des diamètres d'inhibition de 13 mm et 10 mm respectivement, mais les souches *Klebsiella pneumonia* sont non sensibles aux dilutions (1/2 ; 1/4 ; 1/8); *Salmonella enteritidis* était sensible aux HE avec une zone d'inhibition de 11 mm (**Bernaoui et Louetri., 2018**). D'après les travaux de **Chenna et al., (2018)** relatifs à l'activité antibactérienne de l'huiles d'*O. majorana* originaire d'El Oued (Algérie) sur différentes souches bactériennes, Gram positif : (*Bacillus subtilis* et les Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli*, réalisé par la méthode de l'aromatogramme, les résultats obtenus révèlent que cette huile et ses différentes concentrations témoigne d'une forte activité antibactérienne vis-à-vis des 3 souches testées. Cette activité inhibitrice était plus importante avec les bactéries Gram-surtout *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition (0,46±0,23cm), la concentration 1/4 de l'HE avec *E. coli* a donné un meilleur résultat avec un diamètre d'inhibition de 0,50±0,35cm. Aussi, contre *Bacillus subtilis* avec des zones d'inhibitions qui sont 0,40±0,10cm. **Sedlalíková et al., (2017)** ont étudié également l'activité antimicrobienne de l'HE d'*O. majorana* d'Égypte par la méthode de diffusion sur gélose, et les résultats montrent que cette HE possède une activité antibactérienne contre les bactéries et les champignons sélectionnés. Les bactéries les plus sensibles étaient les Gram négatifs (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*) avec des zones d'inhibition de 28.0 ± 3.0 de *S. typhimurium* et 33.5 ± 0.7 pour *E. coli*. Une autre étude, utilisant la méthode de diffusion par disque, a montré un effet antimicrobien remarquable des HEs d'*O. majorana* d'Iran contre les bactéries d'origine alimentaire. Les zones d'inhibition de l'HE étaient supérieures à 12 mm par rapport à toutes les bactéries testées. En outre, la bactérie la plus sensible aux HE était *B. subtilis* par contre la moins sensible était *S. typhimurium* (**Partovi et al., 2018**).

Selon **Hussain et al., (2011)**, les huiles essentielles d'*O. majorana* du Pakistan testées contre des souches bactériennes pathogènes: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella poona*, *Escherichia coli* et *E. coli* résistant à l'ampicilline présentaient une activité antimicrobienne contre toutes les souches bactériennes testées selon la méthode de diffusion de disque et par le test de microtitre de resazurin, avec des grandes zones d'inhibition (16,5-27,0 mm) et des valeurs de CMI plus petites (40,9-1250,3 µg/mL) par rapport aux souches bactériennes d'essai.

Dans l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile d'*O. majorana* du Venezuela par la méthode de diffusion sur gélose, **Ramos et al., (2011)** indiquent que les HES d'*O. majorana* étaient actives contre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* avec des zones d'inhibition 16, 12, 15 et 13 mm respectivement. L'activité antibactérienne des fractions obtenues par chromatographie sur colonne sèche a également été testée. Ils ont constaté que la fraction riche en hydrate de cis-sabinène était plus active que celle riche en terpinène-4-ol. Ils concluent que dans l'HE d'*Origanum majorana*, l'hydrate de cis-sabinène est le composé le plus important responsable de l'inhibition de la croissance bactérienne.

Dans une autre étude, l'expression des résultats de l'activité antibactérienne de l'huile l'*O. majorana* aux différentes concentrations effectuée par la détermination de la CMI par la méthode de dilution **Ahmed Abd el Malek et Yagoubi., (2017)**, a montré que cette HE présente une activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, mais elle était négative contre *Escherichia coli*. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration bactéricide minimale (CMB) de l'huile Essentielle d'*Origanum majorana* contre les bactéries d'origine alimentaire a montré que cette huile possède un effet bactéricide plus fort. La valeur de la CMI était de 0,1% contre toutes les bactéries à l'exception de celle contre *B. Subtilis* (0,3%). Les valeurs des CMB variaient de 0,3% à 0,5%, et la plus élevée a été observée contre *E. coli* (**Partovi et al., 2018**).

Le test de l'activité antimicrobienne de l'HE des feuilles sèches d'*O. majorana* L. de Macapa au Brésil est effectué in vitro contre deux bactéries Gram-négatives (*P. aeruginosa* et *E. coli*) et une bactérie Gram-positif (*S. aureus*) a montré que les bactéries Gram+ étaient plus sensibles celle Gram- qui était résistante à toutes les concentrations (**Chaves et al., 2020**).

4.3. Activité antifongique :

D'après **Lakhrissi et al., (2016)**, les résultats expérimentaux de la détermination du pouvoir antifongique par la méthode de diffusion sur gélose sabouraud montrent que l'huile essentielle d'*O. majorana* de Maroc a une très bonne activité contre la souche *Candida albicans*. Cette huile a donné 18 mm comme zone d'inhibition. Une autre étude est réalisée par **Prakash et al., (2012)** sur le potentiel des huiles essentielles végétales en tant que conservateurs alimentaires en raison de leur efficacité antifongique. L'huile essentielle d'*O. majorana* indienne s'est révélée plus efficace que certains conservateurs organiques courants, car ils inhibaient la croissance et la sécrétion d'aflatoxine de la souche aflatoxigène

Aspergillus flavus (LHP-6) à des concentrations plus faibles. La concentration minimale inhibitrice de l'HE contre la souche toxigène *d'A. Flavus* variait entre 2,0 - 3,0 µl/ml. En outre, l'HE a présenté un large spectre fongitoxique contre neuf moisissures d'origine alimentaire. Les résultats de ces différentes études de l'activité antimicrobienne de ces régions ont confirmé que l'HE d'*O.majorana* manifeste des caractéristiques antimicrobiennes et antifongiques très intéressantes contre les souches testées, avec des diamètres d'inhibition variable selon les souches bactériennes et fongiques testés et la concentration en HE.

4.4. Activité antioxydante :

Les résultats de l'étude de l'activité antioxydante par le test du DPPH a montré que L'HE de l'*O. majorana* a une forte activité antioxydante avec $IC_{50} = 30\text{mg/ml}$, en comparaison avec celles de l'acide ascorbique qui a affiché une activité anti-radicaire élevée (Ahmed Abd el Malek et Yagoubi., 2017). Selon les résultats obtenus par Bernaoui et Louetri., (2018) les HEs d'*Origanum majorana* exercent une activité antioxydante faible avec un $IC_{50} = 6800\mu\text{g/ml}$, qui reste moindre par rapport à l'antioxydant synthétique : la vitamine C avec $IC_{50} = 30\mu\text{g/ml}$. Dans une autre étude, Hussain et al., (2011) ont évalué l'activité antioxydante de l'HE d'*O. majorana* à travers plusieurs tests in vitro. Ils ont montré que, en utilisant le test du DPPH, l'huile essentielle testée a montré une forte activité de piégeage des radicaux avec un fort pouvoir antioxydant et $IC_{50} = 89.2\mu\text{g/ml}$, qui était inférieure à celle du témoin positif le BHT. L'HE d'*O. majorana* représentait également une inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique de 72.8%, qui était légèrement inférieure à celle du témoin positif BHT (90,9%). Cette huile a montré une activité antioxydante plus élevée que le témoin par le blanchiment du β -carotène dans le test du système d'acide linoléique. Cependant, Guerra-Boone et al., (2015) ont rapporté que l'activité antioxydante de l'huile essentielle étudiée dans le nord-est du Mexique était faible, avec des valeurs de concentration efficace (IC_{50}) $<250\mu\text{g} / \text{mL}$. Les résultats de Hajlaoui et al., (2016) sur l'activité antioxydante à l'aide de quatre méthodes colorimétriques complémentaires, à savoir le DPPH, l'activité d'extinction des superoxydes, le pouvoir réducteur et les dosages de β -carotène, ont montré que l'huile essentielle d'*O. majorana* tunisienne présentait une activité antioxydante élevée, en particulier en termes de pouvoir réducteur et de blanchiment au β -carotène, induisant des valeurs IC_{50} supérieures à l'étalon de référence le BHT. L'effet antioxydant de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* d'Egypte a été évalué par Mossa et al., (2011).

Les résultats obtenus ont montré que l'HE a présenté des effets inhibiteurs dépendant de la concentration du DPPH, le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène, le pouvoir réducteur et la peroxydation lipidique avec des valeurs IC₅₀ de 58.67, 67.11, 91.25, 78.67 et 68.75 µg/ml respectivement.

L'activité antioxydante de l'HE d'*O. majorana* de Macapa au Brésil, par la méthode de capture de radicaux DPPH, a montré que l'huile essentielle n'a pas présenté d'activité antioxydante. Les concentrations d'HE obtenues IC₅₀ = 16,83 µg/mL comparées à l'acide ascorbique qui a montré un IC₅₀ = 16,71 µg/mL (Chaves et al., 2020). Par ailleurs, dans l'étude de Semiz et al., (2018) sur l'activité antioxydante des extraits d'*O. majorana* déterminée in vitro par le réactif DPPH, les résultats montrent que cette huile possède un pouvoir antioxydant et une capacité à éliminer les radicaux libres avec IC₅₀ = 46,78%. Les résultats de l'étude de l'activité antioxydante de l'HE d'*O. majorana* sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI. Activité antioxydante des huiles essentielles d'*O. majorana*.

Méthode	IC ₅₀	Résultat	Région	Référence
DPPH	6800(ug/ml)	Faible activité antioxydante	El-Oued (Algérie)	Bernaoui et Louetri., 2018
DPPH	30 (mg/ml)	Forte activité antioxydante	Ben Allel (Algérie)	Ahmed abd el Malek et al., 2017
DPPH	>250 µg/mL	Faible activité antioxydante	Mexique	Guerra-Boone et al., 2015
DPPH	89.2 µg/ml	Forte activité de piégeage des radicaux	Pakistan	Haussain et al., 2011
Système d'acide linoléique	-	72% d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique		
Blanchiment du β-carotène	-	Faible taux d'épuisement de la couleur		
DPPH	62.66 ± 2.08a mg ml ⁻¹	Faible activité de piégeage des radicaux DPPH	Tunisie	Hajlaoui et al., 2016

Activité d'extinction superoxyde	1.66 ± 0.76a mg ml ¹	Puissante activité antioxydante.		
pouvoir réducteur	2.5 ± 0.28b mg ml ¹	Neuf fois plus faible que le BHT		
Blanchiment du β-carotène	12.83 ± 1.04b mg ml ¹	Six fois inférieure à l'antioxydant standard BHT		
DPPH	58.67 μg/ml	Un potentiel significatif pour être utilisé comme antioxydant naturel.	Egypt	Mossa et al., 2011
Le radical hydroxyl (OH)	67.11 μg/ml			
Le peroxyde d'hydrogène(H ₂ O ₂)	91.25 μg.mL			
Le pouvoir réducteur	78.67 μg.mL			
Peroxydation lipidique	68.75 μg.mL			
DPPH	16,83 μg/mL	Manque d'activité antioxydante.	Brésil	Chaves et al., 2020
DPPH	46.78 μg/ml	ont un pouvoir antioxydant	Turquie	Semiz et al., 2018

L'activité antioxydante dépend de la composition chimique notamment des huiles essentielle : le carvacrol, thymol et le linalol qui sont les composés connus pour posséder de fortes propriétés antioxydantes (**Semiz et al., 2018**).

Parmi ces différentes études, l'huile essentielle *d'O. majorana* de la région de Ben Allel (Algérie) est le plus actif avec un IC₅₀ = 30 mg/ml.

Chapitre 11

Matériel et méthodes

Chapitre II. Matériel et méthodes

Introduction

Le présent travail a pour objectifs l'extraction, la récupération des huiles essentielles (HEs) à partir d'*Origanum majorana*, leur caractérisation et l'évaluation de leurs activités biologiques vis à vis de certains agents pathogènes.

Notre travail se subdivise en trois parties :

- L'extraction des huiles essentielles de la plante d'origan (*Origanum majorana*),
- La détermination de la composition chimique des HEs extraites et de leurs caractéristiques physico-chimiques,
- Et l'évaluation de l'activité biologique des HEs extraites.

Notre étude était prévue pour une période de trois mois à partir du mois de mars 2020 pour étudier une espèce botanique d'origan dans les laboratoires de microbiologie du département de biologie et biologie végétale du département de d'agronomie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Terre de l'Université Djilali Bounaama à Khemis Miliana, et au laboratoire d'analyses médicale privé. Mais en raison des conditions que traverse le monde, l'épidémie de Corona Virus, nous n'avons pas pu réaliser ces expériences.

I. Matériel

1. Matériel végétal

L'espèce étudiée, classée selon la systématique de Ietswaart et identifiée comme étant : *Origanum majorana*.

Nous avons étudiée une plante médicinale aromatique appartient à la famille des Lamiacées: *O. majorana*. Les parties aériennes (tiges et feuilles) de la plante ont été récoltée à Khemis Miliana (W. Ain Defla) en mars 2020. Elles sont pesées puis nettoyées et débarrassées de la poussière et d'autres impuretés, ensuite elles sont étalées sur du papier et séchées à l'aire libre, à l'ombre et à l'abri de l'humidité, à une température ambiante pendant un mois afin de préserver au maximum l'intégrité de ses molécules bioactives.

2. Matériel biologique

Les activités antibactériennes de l'HE d'*O. majorana* sont généralement testées sur plusieurs souches bactériennes, à savoir: *Escherichia coli* (Gram-), *Pseudomonas aeruginosa*

(Gram-), *Staphylococcus aureus* (Gram +). L'activité antibiote est également évaluée sur la levure : *Candida albicans*

3. Matériel de laboratoire

• **Appareillage** : Pour la réalisation de l'extraction des HEs de la plante étudiée, et pour les tests biologiques, plusieurs outils et appareils sont utilisés :

- Hydrodistillateur de type Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles,
- Balance pour peser la matière végétale
- Eppendorf utilisés pour la conservation des huiles essentielles
- Ballon à fond rond, - Becher, - Erlenmeyer, - Fiole jaugée
- Micropipette pour un pipetage de précision des huiles essentielles
- Bec bunsen - boîtes pétri - Autoclave - Etuve.

• **Réactifs chimiques et solvants** :

- Méthanol.
- DPPH diphénylpicryl β hydroxyle.
- Ether d'éthylique.
- Sulfate de sodium anhydre.
- Diméthyl Sulfoxyde.

• **Milieux de culture** : Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* sont les suivants:

Pour les souches bactériennes nous utiliserons :

- La gélose nutritive (GN); - La gélose Mueller Hinton (MH)

Et pour les souches fongiques: - La gélose Sabouraud.

II. Méthodes

1. Extraction des huiles essentielles

Le procédé d'obtention des HE a un effet décisif sur sa composition chimique. En effet, l'extraction est présentée comme un procédé de séparation par lequel un matériau peut être traité par différentes méthodes (**Chikhouné, 2007; Hameurlaine et Gherraf., 2009**).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour l'extraction des huiles végétales, cette diversité est due à la variété des matériaux et à la sensibilité de leurs certains constituants. Le choix de la méthode la plus appropriée est basé sur la nature de la matière première végétale à traiter, son état originel et ses caractéristiques et les caractéristiques physico-chimiques d'huiles à extraire, enrichissement ou appauvrissement en certains constituants et leur utilisation (**Desmares et al, 2008**). Parmi ces méthodes: l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur de l'eau, les micro-ondes, l'extraction par des solvants organiques et autres : enfleurage, extraction par fluide supercritique (**Hameurlaine et Gherraf., 2009; Hussain, 2009**).

L'hydrodistillation ou distillation à la vapeur sont les méthodes physiques les plus largement utilisées pour isoler les huiles essentielles du matériel végétal (**Hussain, 2009**).

1.1. Hydrodistillation.

L'hydrodistillation est la méthode standardisée pour l'extraction des huiles essentielles et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements (**Chikhouné, 2007**).

Principe

L'hydrodistillation est la méthode la plus simple dans son principe et son appareillage et la plus anciennement utilisée pour extraire les composés volatils des plantes. Elle est basée sur la puissance de la vapeur d'eau pour transporter l'HE. Cette opération consiste à introduire une quantité de matériel végétale directement dans un ballon en verre contenant une quantité suffisante d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe-ballon. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel végétal, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est évaporée sous l'action de la chaleur pour former un mélange eau/HE. La vapeur chargée d'huile essentielle passe à travers le tube vertical, puis à travers le réfrigérant (condensateur) où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli d'eau distillée. L'HE est séparée de l'hydrolat par différence

de densité car l'huile essentielle est plus légère que l'eau. L'HE obtenue est récupérée puis conservées dans des flacons opaques bien scellés à l'abri de la lumière et à une température de 4 à 6 °C (figure.5). (Boucekrit, 2018 ; Piochon, 2008).

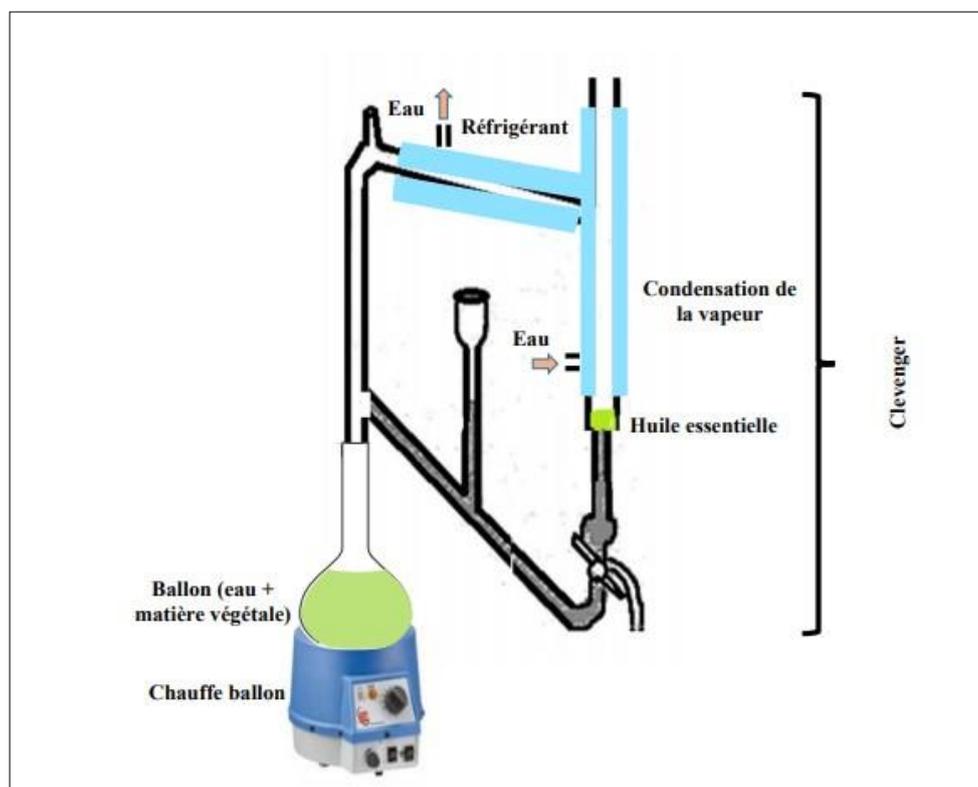


Figure 5. Appareillage d'extraction par hydrodistillation type clevenger (Boucekrit, 2018)

Mode opératoire

L'extraction des huiles essentielles est réalisée à l'aide d'un appareil de type Clevenger où :

-100 g des parties aériennes (feuilles et fleurs) de l'espèce étudiée, est introduite dans un ballon de 2L rempli d'eau jusqu'aux 2/3 de sa capacité. Ce dernier est ensuite mis à ébullition pendant 3 heures.

-La vapeur chargée de produits volatils se condense au contact d'un réfrigérant.

- Le condensât est recueilli dans une ampoule à décanter où s'effectue la séparation des deux phases non miscibles : phase aqueuse et phase organique, cette dernière constitue l'HE qui sera traitée avec du sulfate de sodium anhydre pour éliminer toutes traces d'eau.

- L'HE est séparée du sulfate de sodium par filtration sur de la laine de verre et conservée à une température de réfrigération en vue de son analyse.

1.2. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles d'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (figure.6). La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. (Hameurlaine et Gherraf., 2009).

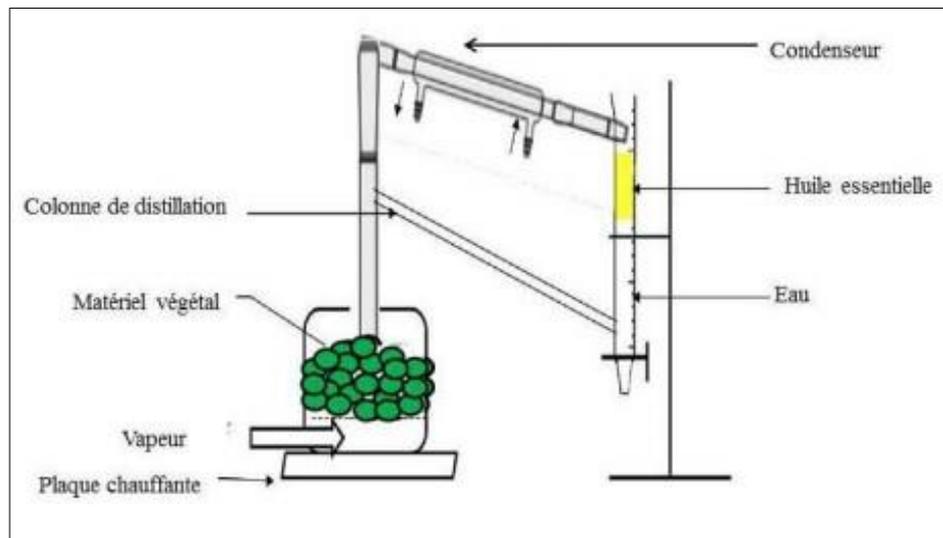


Figure 6. Extraction par entraînement à la vapeur (Mnayer, 2014)

Mode opératoire

Selon la méthode utilisée par Semiz et al., 2018, les parties séchées à l'air de l'espèce *Origanum* ont été soumises à une distillation à la vapeur pendant 4 h à l'aide d'un appareil Clevenger pour obtenir de l'huile essentielle. L'huile essentielle extraite est séchée dans du sulfate de sodium anhydre et après filtration elle est conservée dans un flacon sombre scellé à 4°C jusqu'à l'analyse.

2 - Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans le végétal frais (**Taleb-Toudert, 2015**), il est exprimé en (%) et calculé par la formule suivante:

$$H\% = (P_1 - P_2 / P_1) \times 100$$

H%: Taux d'humidité en %

P₁: Poids de la plante fraîche (g)

P₂: Poids de la plante après séchage (g)

Afin de déterminer la teneur en eau du matériel végétal, un échantillon de 100g de matériel végétal fraîchement récolté est porté au séchage à l'air libre pendant 15 jours. Après le séchage, l'échantillon est pesé jusqu'à ce que son poids devienne stable, on calcule le pourcentage d'eau contenue dans la plante (**Labioud, 2016**).

3 - Calcul du rendement en huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile extraite et le poids de la plante utilisée, exprimé en pourcentage (**Toure, 2015**). Il est estimé en fonction de la matière végétale sèche selon la formule suivante :

$$R_{HE} (\%) = (m_{HE} / m_{MVS}) \times 100$$

Où R_{HE}: Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage %.

m_{HE}: Masse de l'huile essentielle en gramme.

m_{MVS}: Masse de la matière végétale sèche en gramme.

4- Cinétique d'extraction de l'huile essentielle

La cinétique est l'évaluation de la quantité d'HE extraite par hydrodistillation d'une masse de végétal en fonction du temps. L'étude de la cinétique d'extraction est effectuée par la réalisation des prélèvements horaires à des intervalles réguliers sur les phases aqueuses et organiques durant l'hydrodistillation pour en récupérer des quantités significatives. Les essences sont extraites avec un solvant organique (éther d'éthylque) (**Talab-toudert, 2015 ; Boukhatem et al., 2010**). Le but cette étude est de déterminer le moyen qui permet d'obtenir les

rendements les plus intéressants (Chikhoun, 2007).

5. Analyses des huiles essentielles extraites :

L'analyse et la caractérisation d'une huile essentielle consiste à:

- Contrôler et vérifier ses caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur, saveur);
- Déterminer ses caractères physico-chimiques (densité, indice de réfraction...);
- Obtenir son profil chromatographique et identifier ses différents constituants.

5.1. Détermination des caractéristiques des huiles essentielles

Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques des huiles essentielles constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de ces HE (Boukhatem et al., 2010).

5.1.1. Propriétés organoleptiques d'huiles essentielles

La première étape après l'extraction des huiles essentielles est la vérification et l'appréciation des caractéristiques organoleptiques de l'huile: couleur, odeur, aspect, viscosité etc... (Poirot, 2016).

La détermination des différentes propriétés organoleptiques de l'huile essentielle d'*O. majorana* sont observées et évaluées sur la base de la méthode sensorielle impliquant la vision et l'odorat (Likibi, et al., 2019).

5.1.2. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

La connaissance des indices physico-chimiques des HEs est importante puisqu'elle permet la caractérisation et l'identification de cette huile extraite.

5.1.2.1. Propriétés physiques

❖ La densité

La densité relative à 20°C 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 (Mohamdi, 2006). Elle est évaluée à l'aide d'un pycnomètre selon la norme NF ISO 279 (Poirot, 2016) et est calculée à partir de la formule suivante :

$$D_{20} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)$$

D_{20} : densité relative à 20°C.

m_0 : la masse en gramme du pycnomètre vide,

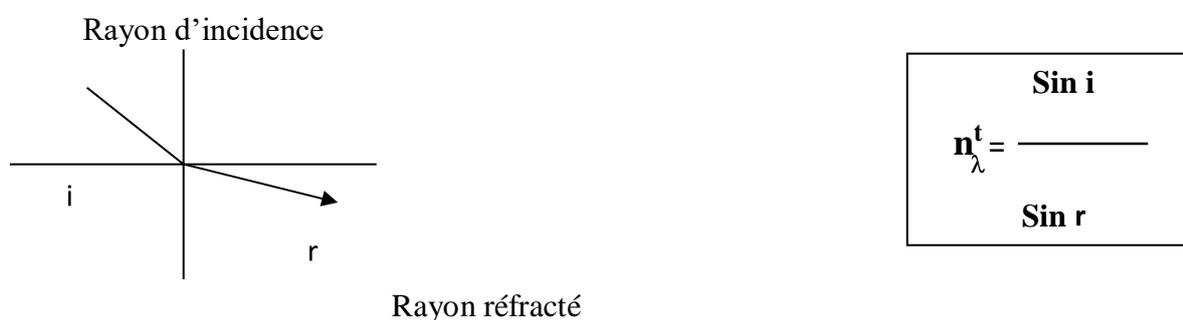
m_1 : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau distillée,

m_2 : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile (Seddik, 2010).

La mesure de la densité consiste à peser successivement des volumes égaux d'huile essentielle et d'eau à la température de 20 °C à l'aide d'un pycnomètre (Kholkhal, 2014).

❖ **L'indice de réfraction:**

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante (Boukhatem et al., 2010). Il permet de mesurer le pouvoir réfringent des huiles à 20°C par rapport à la raie «D» du sodium ($\lambda=589$ nm) d'où la notation n_{λ}^t (Seddik, 2010).



La mesure de l'indice de réfraction est effectuée à l'aide d'un réfractomètre, elle consiste à mettre deux (2) à trois (3) gouttes d'huile essentielle sur le prisme du réfractomètre. On regarde dans l'oculaire en tournant le bouton de réglage jusqu'à ce que la ligne de séparation de la zone claire et de la zone sombre soit au centre du réticule. On lit la valeur de l'indice de réfraction de l'huile essentielle sur l'échelle de lecture.

L'indice est donné par lecture sur le réfractomètre à la température T à laquelle la lecture est effectuée. Celui-ci est ramené à 20°C selon la formule suivante (Likibi et al., 2019) :

$$n_{20} = n_T + 0,00045(T-20)$$

Avec T : température à laquelle la lecture est effectuée.

❖ Mesure du pH

Cette mesure est effectuée à l'aide d'un pH-mètre (**Boukhatem et al., 2010**).

5.1.2.2. Propriétés chimiques

Les différentes analyses chimiques complèteront les résultats obtenus par analyse physique pour certifier la qualité de l'HE testée (**Poirot, 2016**).

❖ L'indice d'acide

C'est le nombre de mg de potasse KOH nécessaire pour neutraliser les acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. Les acides libres sont neutralisés par une solution EtOH titrée de KOH (**Boukhatem et al., 2010**). Cet indice permet de vérifier la qualité d'une HE, notamment la détérioration et le vieillissement de ce dernier pendant le stockage (**Likibi et al., 2019**). L'indice d'acide est donné par la formule suivante (**Taleb-Toudert, 2015**):

$$I_A = V \times C \times (56.11 / M)$$

Où:

I_A : Indice d'acide.

V : Volume de KOH utilisé (ml).

C : Concentration exacte, en moles par litre de la solution de KOH.

M : Masse de la prise d'essai.

Principe

La méthode pour déterminer l'indice d'acide consiste à placer 1 gramme d'huile essentielle dans un erlenmeyer dans lequel 5 millilitres d'éthanol à 95% et 5 gouttes de phénolphaléine (indicateur coloré) sont ajoutés. Le mélange est chauffé dans un bain-marie jusqu'à environ 65°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, il est titré avec une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) de concentration 0,1N à l'aide d'une burette, jusqu'à ce que la solution vire au rose (**Likibi et al., 2019**).

❖ L'indice d'ester :

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'HE. L'hydrolyse des esters présents dans l'HE se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution EtOH titrée de KOH et dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution titrée d'HCl (**Boukhatem et al., 2010**).

L'indice d'ester (I_e) est calculé par la relation (**Seddik, 2010**):

$$I_e = \frac{28,05}{m} (V_0 - V_1) - I_a$$

Avec :

I_a : l'indice d'acide

V_0 : Volume en mL de la solution d'HCl (0,5N) mesuré pour l'essai à blanc

V_1 : Volume en mL de la solution d'HCl (0,5N) mesuré pour le calcul de I_e

m : Masse en g de la prise d'essai

Principe

Cette méthode est basée sur l'hydrolyse des esters par chauffage en présence d'une solution éthanolique, titrée d'hydroxyde de potassium, et doser l'excès d'alcali par une solution titrée. Elle consiste à mettre la solution résultante de l'indice d'acide dans un ballon, à ajouter 25 mL d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0.5 mole/l, puis le réfrigérant est conditionné, placé sur le chauffe-ballon et laissé chauffer pendant une heure. Il est laissé refroidir puis démonter le réfrigérant et ajouter 20 millilitres d'eau et 5 gouttes d'une solution de phénolphthaléine à 0,2%. L'excès d'hydroxyde de potassium est titré avec une solution d'acide chlorhydrique (0,5 mole / l); en même temps, un test à blanc est réalisé dans les mêmes conditions en remplaçant la solution obtenue à partir de l'indice d'acide par 5 mL d'éthanol (**Kholkhal, 2014**).

❖ L'indice de saponification

L'indice de saponification est le nombre en milligrammes de potasse caustique (KOH), nécessaire pour transformer en savon les acides gras et les triglycérides d'un gramme de corps

gras. Le principe consiste à titrer l'excès d'hydroxyde de potassium en solution par l'acide chlorhydrique (Seddik, 2010).

L'indice de saponification est donné par la formule :

$$I_s = \frac{N.(V_0 - V)}{P} \quad (\text{mg KOH / g d'H.E})$$

avec :

V_0 : volume de la solution d'acide chlorhydrique en mL pour l'essai à blanc

V : volume de la solution d'acide chlorhydrique en mL utilisé pour la prise d'essai

N : normalité exacte de la solution d'acide chlorhydrique

P : poids en gramme de la prise d'essai (Seddik, 2010).

5.2. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

Une connaissance parfaite de la composition chimique des huiles essentielles est pour les différents secteurs de l'industrie pharmaceutique, alimentaire et cosmétique qui leur permettent de contrôler leur qualité et de les valoriser. L'analyse des huiles essentielles et l'identification de ses composants reste une étape importante et délicate qui nécessitant la mise en œuvre de diverses technique (Paolini, 2005). La chromatographie fait partie des tests utilisés pour contrôler les huiles essentielles fréquemment utilisées pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle est basée sur les différentes affinités des substances à analyser par rapport à deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique utilisée, la séparation des composants entraînés par la phase mobile résulte soit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leurs différentes solubilités dans chaque phase et il en existe plusieurs techniques (Boucekrit, 2018).

5.2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est une technique courante utilisée dans l'analyse des huiles essentielles, elle permet la séparation et l'identification de composés volatils à partir de mélanges très complexes et d'obtenir une valeur approximative des concentrations respectives, et effectue une analyse à la fois qualitative et quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit, les temps de rétention peuvent donner des informations sur la

nature des molécules et les aires des pics fournissent une estimation relativement quantitative (**Chikoune, 2007; Labiod, 2016 ; Hameurlaine et Gherraf., 2009**). Cette technique chromatographique permet l'individualisation des constituants et le calcul de leurs indices de rétention (Ir), puis à les analyser par le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale. L'identification est réalisée par comparaison des indices de rétention Ir et des données spectrales (spectres de masse ou infrarouge) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence dans des bibliothèques de spectres (**Paolini, 2005**).

Principe

La CPG est basée sur le partage de l'analyte entre une phase gazeuse mobile et une phase (solide ou liquide) immobilisée à la surface d'un support inerte. L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'éluion est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. Les constituants des mélanges appelés « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. A partir de ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ce qui les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. Tout d'abord, un signal dit de ligne de base est enregistré en présence du gaz vecteur seul, puis un pic lorsque chaque soluté séparé passe (**Chikoune, 2007**).

Mode opératoire

Selon la méthode décrite par **Hussain et al., (2011)** pour la détermination de la composition des huiles essentielles, effectuée par chromatographie en phase gazeuse (GC), les huiles essentielles sont analysées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Perkin-Elmer modèle 8700, comprenant un détecteur à ionisation de flamme (FID) et une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 µm) dont les conditions opératoires sont les suivantes:

- gaze porteur: hélium avec un débit de 1,5 ml / min.
- température de l'injecteur et du détecteur: 220°C et 290 ° C respectivement.
- programmation de température du four à colonne: 80 °C à 220 °C à la vitesse de 4 °C / min.
- les températures initiale et finale ont été maintenues respectivement pendant 3 et 10 minutes.
- Un échantillon de 1,0 µL d'HE est injecté, en utilisant le mode fente (rapport de division, 1: 100). Toutes les quantifications ont été effectuées par un programme intégré de traitement des

données de l'équipement utilisé (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). La composition est rapportée en pourcentage relatif de la surface totale du pic.

5.2.2. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

La CPG couplée à la SM est la méthode de routine la plus courante utilisée pour l'analyse des huiles essentielles, qui combine à la fois les performances de la chromatographie en phase gazeuse, permettant l'identification d'un grand nombre de composants dans des mélanges complexes. Dans la grande majorité des cas, il permet de connaître la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (**Hameurlaine et Gherraf., 2009; Boucekrit, 2018 ; Labiod, 2016**).

Principe

Cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils seront fractionnés en ions de masse variables et ils vont être distribués suivant leur rapport masse/charge. Après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées. Finalement, l'outil informatique enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs de masses et d'intensités de pics puis en courant ionique total. Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles commerciales (**Boucekrit, 2018**).

Mode opératoire

Selon **Guerra-Boone et al., (2015)**, l'analyse GC-MS des huiles essentielles est réalisée par un chromatographe en phase gazeuse Agilent Technologies 6890N (dimensions de la colonne, 30 mx, 0,25 mm de diamètre interne, épaisseur de film de 0,25 µm) connecté à un spectromètre de masse sélectif 5973 INERT HP5MS, dont les conditions opératoires sont les suivantes:

- La température de la source d'ionisation : 230 °C,
- La température du quadripôle : 150 °C
- La température de l'injecteur : 220 °C.
- La température du four GC est maintenue à 35°C pendant 9 min, puis augmentée de 3°C /

min à 150 °C et maintenue pendant 10 min, augmentée de 10 °C / min à 250 °C et augmentée de 3°C / min à 270 °C et maintenu pendant 10 min.

- Le gaz porteur : hélium (pureté de 99,999%) avec débit de 0,5 ml / min, et l'énergie d'ionisation était de 70 eV.

Les échantillons sont injectés en mode sans division. Le volume d'injection est de 2 µl d'une solution d'huile (2 mg / ml dans du chlorure de méthylène). Les spectres MS sont acquis en mode balayage.

L'identification des composants de l'huile s'est faite par comparaison de leurs indices de rétention aux n-alcane C₈-C₂₀ (Sigma-Aldrich) et par comparaison de leurs spectres MS avec ceux de la bibliothèque et des données de référence de l'Institut National des Standards et Technologie (NIST) des États-Unis.

6- Activités biologiques des huiles essentielles

6.1. Évaluation de l'activité antioxydante

L'oxydation est une réaction chimique qui transfère les électrons d'une substance à un agent oxydant. Les radicaux libres produits par ces réactions d'oxydation, déclenchent des réactions en chaîne qui endommagent les cellules, et peuvent causer des dommages fonctionnels au corps humain. Les antioxydants terminent ces réactions en chaîne en éliminant les intermédiaires de radicaux libres et inhibent d'autres réactions d'oxydation en étant eux-mêmes oxydés (Wollinger *et al.*, 2016; Donath, 2016).

6.1.1. Radicaux libres et le stress oxydatif

Les antioxydants végétaux sont très importants car leur présence dans l'alimentation humaine peut aider le corps à neutraliser les radicaux libres et à réduire les dommages de stress oxydatifs. A l'inverse, les antioxydants synthétiques (comme le BHT, BHA et TBHQ) ont des effets toxiques et cancérigènes sur les systèmes humains et alimentaires (Hussain, 2009; Carović-Stanko *et al.*, 2016). Pour cette raison, l'utilisation d'extraits naturels de plantes représente un potentiel inestimable pour la recherche de nouvelles substances comme antioxydants naturels dans l'industrie alimentaire. Les huiles essentielles de plusieurs plantes telles que l'origan, thym, cannelle, persil,...sont connues pour avoir divers degrés d'activités antioxydantes. Certaines de ces HEs sont signalées à être plus efficace que certains antioxydants synthétiques. Ces effets antioxydants de ces huiles essentielles sont dus principalement à la présence de groupes hydroxyles dans leur composition chimique, et est

étroitement liée à tout le contenu phénol. Le thymol et le carvacrol sont deux des composés les plus actifs (Wollinger *et al.*, 2016; Hussain, 2009; Abou et Fareh., 2017; Ismaili *et al.*, 2017; Bouchekrit, 2018).

6.1.2. Antioxydants :

Les antioxydants sont des molécules capables qui peuvent inhiber ou retarder les processus oxydatifs en interdisant l'initiation ou la propagation des réactions en chaîne oxydant en sacrifiant leurs propres électrons pour nourrir les radicaux libres et les rendent inoffensifs et empêchent ces radicaux d'endommager les cellules saines sans de devenir eux même des radicaux libres. Ces antioxydants peuvent protéger le corps humain en retardent la progression de nombreuses maladies chroniques. Il peut également être utilisé comme additif alimentaire pour fournir une protection contre la dégradation par oxydation dans les aliments. (Gülçin *et al.*, 2010; Dontha, 2016)

6.1.3. Méthodes d'étude de l'activité des antioxydants

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Plusieurs méthodes sont utilisées *in vitro*, pour l'évaluation de l'activité antioxydante qui peuvent être divisées en 2 groupes: les méthodes basées sur le transfert d'un atome d'hydrogène ou Hydrogen Atom Transfert (HAT) tels que: la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Reactive Antioxidant Potential) et les méthodes basées sur le transfert d'un électron ou Single Electron Transfert (SET) notamment: méthode du DPPH (2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazil) considéré aussi comme méthode HAT, donc mixte, TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) et FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (Popovici *et al.*, 2010; Diallo, 2019).

L'essai de piégeage des radicaux 2,2-di (4-tert-octaphényl) -1-picrylhydrazyl (DPPH.) est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits de plantes (Hussain, 2009).

6.1.3.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH :

Le test de piégeage des radicaux DPPH est une méthode colorimétrique, simple, rapide et peu coûteuse pour mesurer la capacité antioxydante des huiles en utilisant le radical libre (DPPH) (2,2-Diphényl Picryl-Hydrazyl). Elle basée sur la capacité des antioxydantes à donner un électron au radical synthétique DPPH* (2.2 diphenyl 1 picrylhydrazyl). Cette

réduction se traduit par un changement de la couleur violette de la solution éthanolique de DPPH vers une coloration jaunâtre (Molyneux, 2004; Ramadan, 2010).

Le DPPH (1,1-diphényl -2- picrylhydrazyle) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; $M= 394,33g/mole$) est un radical libre stable, qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, caractérisé par une couleur violette et un pic d'absorption spectrale maximale à 517nm, couramment utilisé comme substrat, pour évaluer l'activité antioxydante in vitro d'extraits de plantes médicinales de fruits, et de légumes. Les antioxydants peuvent piéger le radical par don d'hydrogène, ce qui provoque une diminution de l'absorbance de DPPH à 517 nm (figure.7) (Boucekrit, 2018; Maral et al., 2017).

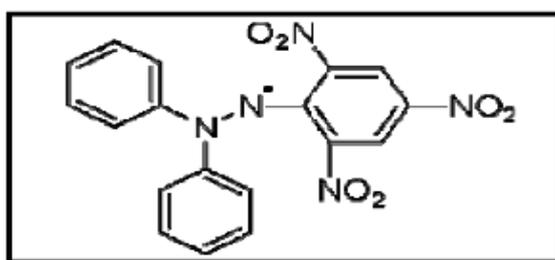


Figure 7. Structure chimique du radical libre DPPH (Popovici et al., 2009)

Principe du DPPH

En présence d'antioxydant, l'électron célibataire du radical DPPH est piégé soit par liaison à un atome d'hydrogène du groupement hydroxyle ou la libération d'un électron, et devient apparié, ce qui conduit à la décoloration de DPPH du violet (forme radicalaire DPPH[•]) au jaune (forme réduite DPPH-H) (figure.8), dont l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration des antioxydants présents dans le milieu. Cette décoloration représente la capacité d'échantillon de piéger ce radical (Kahouli, 2010 ; Bouzabata, 2015; Boucekrit, 2018).

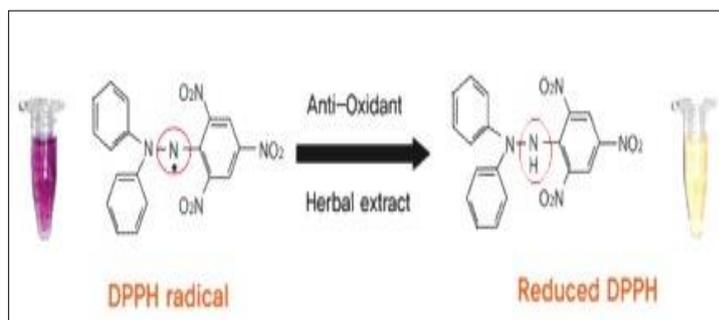


Figure 8. La forme radicalaire du DPPH et sa réduction par un antioxydant (Boucekrit, 2018)

Mode opératoire

Selon **Hussain et al., (2011)**, le protocole expérimental pour étudier l'activité de piégeage des radicaux libres des huiles essentielles d'*Origanum* était évaluée en mesurant leur capacité à piéger les radicaux stables du DPPH. Le test du DPPH est réalisé comme suit :

- Les échantillons (de 0,5 à 500,0 µg / mL) sont mélangés avec 1 mL de solution de DPPH à 90 µM et complétés avec 95% de méthanol, jusqu'à un volume final de 4 mL.
- Un antioxydant synthétique, l'hydroxytoluène butylé (BHT) a été utilisé comme témoin.
- Après une période d'incubation de 1 h à température ambiante, l'absorbance a été enregistrée à 515 nm.
- Le pourcentage de concentration de piégeage des radicaux a été calculé à l'aide de la formule suivante: **$I\% = \frac{(\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{test}})}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \times 100$** .

Où : $\text{Abs}_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance du contrôle (contenant tous les réactifs à l'exception des huiles essentielles de test),

Abs_{test} est l'absorbance des huiles / composés essentiels de test.

Les valeurs IC_{50} qui représentaient la concentration d'huile essentielle qui causait 50% de piégeage, ont été calculées à partir du graphique du pourcentage de piégeage par rapport à la concentration.

-Expression des résultats :**Calcul des IC_{50} :**

L' IC_{50} ou concentration inhibitrice est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. L' IC_{50} est calculée graphiquement par la régression linéaire du graphe tracé : pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des échantillons testés. Ainsi, la valeur IC_{50} est liée négativement à l'activité antioxydante; plus la valeur IC_{50} est faible, plus l'activité antioxydante de l'échantillon testé est élevée (**Maral et al., 2017; Boucekrit, 2018**).

L'indice de l'activité antioxydante (AAI) : Il est calculé selon l'équation suivante:

$$\text{AAI} : \text{Concentration finale de DPPH } (\mu\text{g/ml}) / \text{IC}_{50} (\mu\text{g/ml})$$

Les résultats d'AAI sont exprimés comme suit:

AAI < 0.5 : → faible activité antioxydante.

1 > AAI > 0.5 : → activité antioxydante modérée.

2 > AAI > 1 : → forte activité antioxydante.

3 > AAI > 2 : → très forte activité antioxydante (**Bouhaddouda, 2016**).

6.2.Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Il existe deux sortes d'effets des huiles essentielles sur les microorganismes : une activité létale (bactéricidie) et une inhibition de la croissance (bactériostase). L'activité des huiles essentielles est souvent assimilée à une activité bactériostatique. Cependant plusieurs études ont montré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des propriétés bactéricides et fongicides (**Chickoune, 2007**).

6.2.1. Activité antibactérienne

La plupart des huiles essentielles ont un spectre d'action très étendu contre une large gamme de microorganismes desquels les bactéries, les levures et les champignons, les virus et les protozoaires. Nombreuses de ces huiles sont considérées comme des agents antimicrobiens les plus efficaces parmi les extraits aromatiques de plantes. Elles peuvent être employées pour la protection contre les microorganismes envahissant les denrées alimentaires et dans différentes formulations, comme les médicaments et les parfums. Cette activité antimicrobienne est notamment due à la grande complexité de la composition chimique des HE, et en particulier à la nature de leurs principaux composés volatils. Les phénols (carvacrol, thymol) ont le facteur antibactérien le plus élevé, suivis des monoterpénols (géraniol, menthol) et des aldéhydes (néral, gèranial). En général, l'activité diminue selon le type de fonction chimique: phénol > alcool > aldéhyde > cétone > ester > hydrocarbure (**Toure, 2015 ; Bouhaddouda, 2016**)

6.2.2. Activité antifongique

Les huiles essentielles et leurs composés actifs peuvent être utilisés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes ainsi que dans le traitement des infections fongiques affectant l'homme (**Bouhaddouda, 2016**). Les plus étudiées pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des Labiatae et sont : le thym, l'origan, la lavande, la

menthe, le romarin et la sauge. Étant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, il a été démontré que cette activité antifongique augmente selon le type de fonction chimique: Phénols> Alcools> Aldéhydes> Cétones> Ethers> Hydrocarbures.

Parmi les aldéhydes, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actifs (**Labiod, 2016**).

6.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Il existe différents méthodes utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Le test de diffusion sur disque, le test de diffusion dans le puits, le test de microdilution, la mesure de la concentration minimale inhibitrice sont souvent utilisés pour mesurer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des constituants à base de plantes.

Le dépistage des huiles essentielles pour l'activité antibactérienne est souvent effectué par le test de diffusion sur disque. Ceci est généralement utilisé comme un contrôle préliminaire de l'activité antibactérienne avant des études plus détaillées (**Hussain, 2009**).

6.3.1. Étude qualitative de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle

❖ Méthode de diffusion en milieu gélosé

Principe :

L'aromatogramme ou méthode par diffusion dans un milieu gélosé ou encore méthode de disques est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité de microorganismes à une substance connue comme antibactérienne. Ce test se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques, préalablement sélectionnées et reconnues. Il consiste à déposer un disque stérile en cellulose imprégné de l'HE à tester, à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de pétri etensemencée avec le micro-organisme testé. Après incubation, les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle sur la cible est évaluée en mesurant la zone d'inhibition (diamètre d'inhibition). Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique; plus il est

petit et plus la bactérie est résistante (figure.9). (Mahfouf, 2018; Chikhoun, 2007; Labiod, 2016).

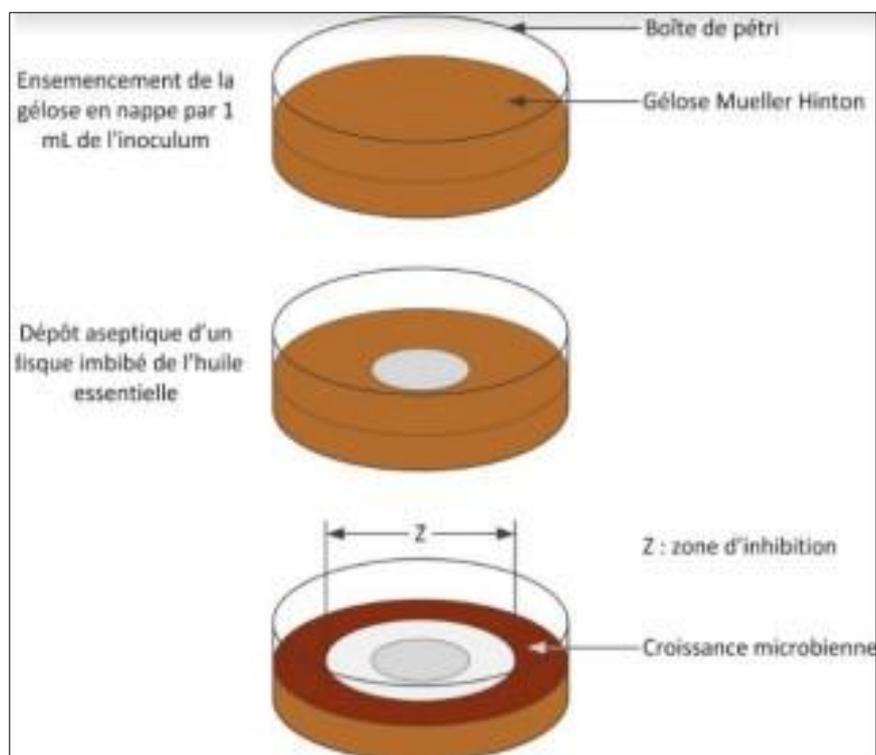


Figure 9. Illustration de la méthode d'aromatogramme (Soulet, 2017)

Mode opératoire

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est réalisée par la méthode des disques, en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries (figure.10). (Boucekrit, 2018).

• Pour les bactéries :

-La gélose de Mueller Hinton et Sabouraud stériles ont été coulées dans des boîtes de Pétri stériles, puis ont été séchées pendant 30 min à la température du laboratoire et laissées 24h/37°C.

- Après l'extraction des HE par hydrodistillation, on prépare trois dilutions: 1/2, 1/5, 1/10 (v/v) dans le DMSO.

- Chaque souche bactérienne a été ensemencée en stries sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive et incubée pendant 18 heures, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et

des colonies bien isolées. Après les 18 heures et à partir de ces boîtes, on a prélevé quelques colonies bien isolées avec une anse de platine ou pipette Pasteur et les transférer dans un tube contenant 9 ml d'une solution de l'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (NaCl) afin d'avoir une densité cellulaire initiale voisine à celle de 0,5 Mc Farland (106 UFC/ml). Cette comparaison est mesurée à l'aide d'un densitomètre.

• Pour les champignons :

- Dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Sabouraud solide, déposé un disque de 6 mm de chaque souche fongique au centre de chaque boîte, et les a incubé jusqu'à ce que la croissance mycélienne atteigne les bords des boîtes de Pétri et ensuite la sporulation. A partir de ces boîtes, la mise en suspension des champignons a été réalisée dans de l'eau physiologique stérile à 0.9% afin d'obtenir une suspension de spores égale à 106 spores/ml mesurée avec la cellule de Malassez.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum

- Un écouvillon est trempé dans la suspension et étalé sur toute la surface de la gélose (MHA) pour les bactéries ou Sabouraud pour les champignons.

- Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de 6 mm de diamètre de papier 3MM stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage) sont déposés sur la gélose précédemment inoculée avec le microorganisme choisi, puis les imbibés par les différentes dilutions des HE (1/2, 1/5 et 1/10; v/v). Chaque disque contient 10 µl d'une seule dilution d'une huile essentielle,

- Autres disques imprégnés chacun de 10 µl de DMSO sont utilisés comme témoins négatifs. La gentamicine (GM=10mg) est utilisée comme témoins positifs pour les souches bactériennes, alors que la Nystatine et Dividend ont été utilisés pour les souches fongiques.

- Le test est effectué en triple et les antibiogrammes sont effectués en parallèle avec les aromatoigrammes.

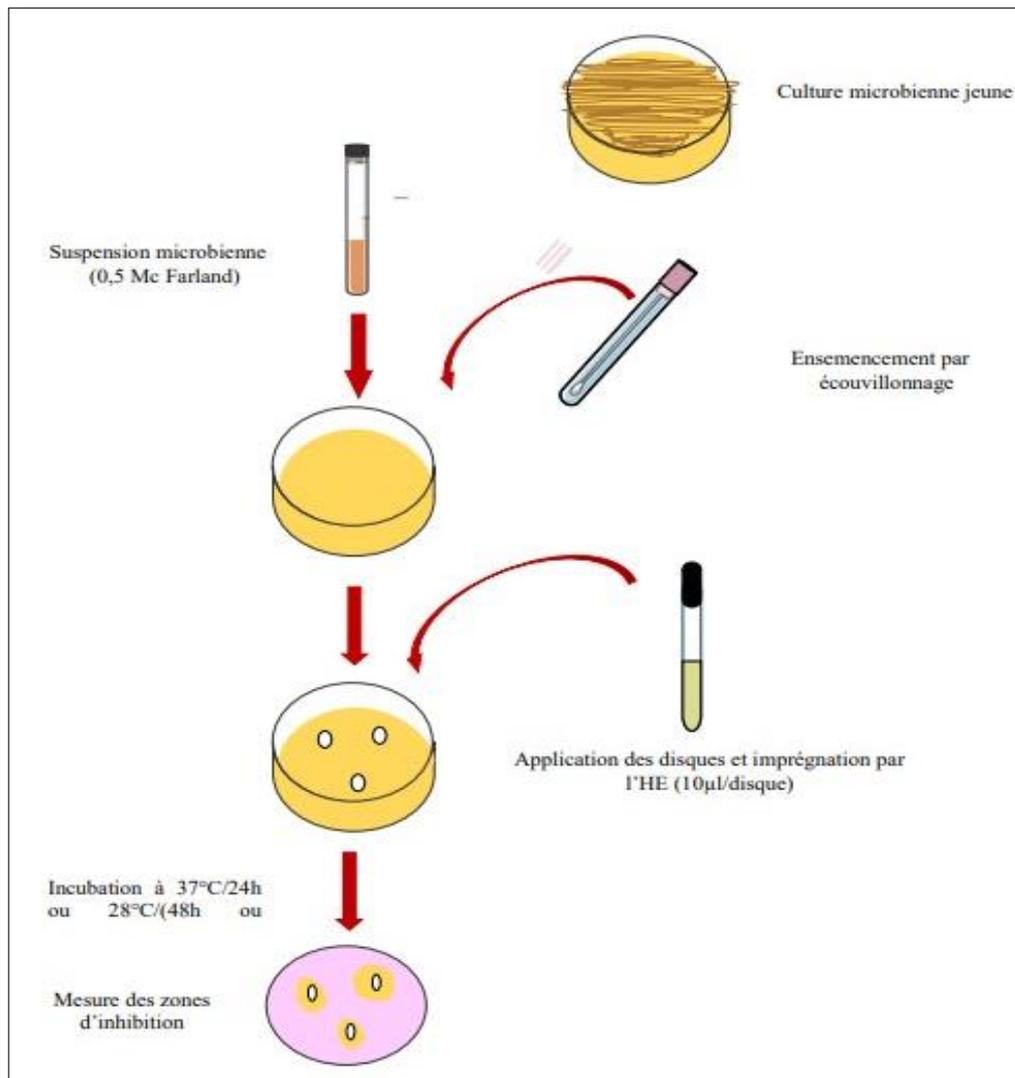


Figure 10. Technique de diffusion sur gélose par disque (Boucekrit, 2018)

-Expression des résultats :

L'activité antibactérienne est évaluée en mesurant la zone d'inhibition de la croissance autour des disques après 24 h d'incubation à 37 ° C. L'action inhibitrice est classée en fonction de la zone d'inhibition (ZI):

Forte action inhibitrice (++++), $ZI \geq 22$ mm;

Action inhibitrice complète (+++), $ZI = 18-21$ mm;

Action inhibitrice partielle (++) , $ZI = 14-17$ mm,

Légère action inhibitrice (+), $ZI \leq 13$ mm ou pas d'action inhibitrice (-), $ZI = 0$.

Chaque expérience a été réalisée en triple et le diamètre moyen de la zone d'inhibition a été enregistrée (Lagha *et al.*, 2019) .

6.3.2. Étude quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle

❖ Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) par la méthode des microdilutions en milieu liquide

Principe

La mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est la méthode la plus citée et la plus importante dans la performance antimicrobienne des huiles essentielles qui nous indique des résultats précis, exactes et reproductibles (Hussain, 2009).

La méthode de dilution en milieu liquide ou la méthode de microdilution est une méthode quantitative qui permet de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI), habituellement exprimée en mg/mL ou mg/L. La CMI est étudiée seulement pour les microorganismes sensibles aux extraits (Toure, 2015; Labiod.2016). Cette technique consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié. Elle est réalisable par contact direct en milieu gélosé ou liquide (Bouhadouda, 2016).

La concentration minimale inhibitrice (CMI)

Elle peut être déterminée par contact direct en milieu gélosé ou en milieu liquide. Elle correspond à la concentration nécessaire pour inhiber totalement la croissance d'un nombre déterminé de germes après un temps d'incubation donné.

La concentration minimale bactéricide (CMB)

Elle est appelée aussi concentration minimale létale (CML). Elle correspond à la concentration en agent inhibiteur nécessaire pour que l'activité bactéricide soit totale sur un inoculum donné après un temps bien déterminé. Elle est estimée en milieu liquide par l'évaluation des survivants après élimination du composé inhibiteur (Chickoune, 2007).

Mode opératoire

Les valeurs des CMI des huiles essentielles sont déterminées par la méthode de microdilution comme décrit par **Bouhadouda**, (2016) pour les souches bactériennes sensibles aux huiles essentielles dans l'essai de diffusion sur disque.

- A partir de la solution mère des huiles essentielles à 50 mg/ml (dans le DMSO à 10%), on prépare une gamme de concentration d'huiles essentielles par la méthode de dilution en progression géométrique à raison de 2 dans des tubes contenant MHB pour aboutir à des concentrations allant de 0,048 - 50 mg/mL.
- Les plaques de 96 puits sont préparées en distribuant dans chaque puits 95 µl de MHB et 5 µl de l'inoculum préalablement préparé.
- 100 µL de la solution mère des huiles essentielles initialement préparée d'une concentration égale à 50 mg/mL sont ajoutés dans les premiers puits.
- 100 µL de chaque dilution sont transférés dans les 10 puits consécutifs.
- Le dernier puit contenant 195 µL de MHB sans huile essentielle et 5 µL de l'inoculum est utilisé comme contrôle négatif. Le volume final dans chaque puits est de 200 µL.
- Les plaques sont couvertes avec du parafilm stérile et sont ensuite incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Pour le calcul des CMB, on prélève un volume de 100 µl de chaque puit qui ne montre pas une croissance bactérienne et on l'ensemence sur un milieu de gélose nutritive qu'on incube à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

- Expression des résultats :

- La croissance bactérienne est indiquée par la présence d'un "culot" blanc sur le fond du puit.

A titre d'indicatif de la croissance de microorganismes, 10 µl de nitrobleu tetrazolium (NBT) à une concentration de 2 mg/ml dans l'eau distillée stérile sont ajoutés aux puits et incubés à 37 °C pendant 30 min. Le sel de NBT agit comme un accepteur d'électrons et la couleur jaune de l'NBT est réduite en un produit formazan bleu-violet par les organismes biologiquement actifs (bactéries viables).

- La CMI est indiquée par le puit qui contient la plus faible concentration d'huile essentielle

où il y'a absence de croissance bactérienne et qui ne montre pas un changement de couleur.

- Les CMB sont interprétées comme la plus haute dilution (concentration la plus basse) de l'huile essentielle qui a montré un liquide clair sans le développement de la turbidité et sans croissance bactérienne visible sur la boîte de Pétri.

Le calcul du rapport CMB/CMI permet la détermination du pouvoir antibiotique de l'huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 4, on dit que l'extrait est bactéricide et lorsqu'il est supérieur à 4, l'extrait est qualifié de bactériostatique (**Bouhadouda, 2016**).

Chapitre III

Résultats et discussion

Résultats

Nos travaux ont été menés dans le but d'extraire des huiles essentielles d'*Origanum majorana*, de déterminer sa composition chimique et d'évaluer ses activités biologiques, mais nous n'avons pas pu obtenir les résultats attendus, en raison des conditions exceptionnelles que connaît l'Algérie, comme c'est le cas pour tous pays du monde, du fait de la pandémie Corona Virus. Nous n'avons pas pu compléter et suivre nos expériences.

Conclusion

Conclusion

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressées à l'extraction et à la récupération de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* de la région de Khemis Miliana, la détermination de sa composition chimique et l'évaluation de son activité biologique. Selon les travaux rapportés par la littérature, nous concluons ce qui suit :

Tout d'abord, l'extraction de l'HE d'*O. majorana* par hydrodistillation a donné des rendements différents selon les pays, le meilleur rendement de la plante sèche dans le monde est enregistré en Égypte, il est de (3%) et en Algérie il est compris entre (0,61-2,36%).

L'analyse de l'HE d'*Origanum majorana* par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a montré que les résultats enregistrés en Algérie étaient variables d'une région à une autre. Dans la région d'El Oued, le bornéol (15.50%) et l'eucalyptol (11.33%) sont les composés majoritaires de l'HE, cependant dans la région de Ben Allal le 4-terpinéol (13.94%), Terpinolène (9.43%) sont les principaux composés. En ce qui concerne les divers pays du monde, la composition chimique était aussi différente où en Turquie les principaux composants sont : linalool (38.38%), thymol (26.11%) et en Egypte, le terpinen-4-ol (31%) et γ -terpinène (13%) étaient les principaux composés, tandis qu'en Iran les constituants majoritaires sont: le carvacrol (57.86%), thymol (13.54%). Alors que les principaux constituants de l'HE d'*O. majorana* du Venezuela sont: l'hydrate de cis-sabinène (30,2%), terpinène-4-ol (28,8%). En outre, Au Brésil le 1.8-cinéole (20.9%) était le principal composé suivi du 4-terpinéol (20.4%) alors qu'au Canada, les principaux composants de l'huile d'*O. majorana* sont le terpinen-4-ol (38,3%) et α -terpinène (12,5%).

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH des huiles essentielles d'*O. majorana* d'Algérie a montré que ces huiles possèdent un pouvoir antioxydant fort. Par ailleurs, cette activité était forte au Pakistan, en Egypte et en Turquie alors qu'elle est faible au Mexique et en Tunisie et absente au Brésil.

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'HE l'*O. majorana* montre que cette huile possède des activités antibactériennes et antifongiques importantes vis-à-vis de la plupart des souches testées avec des zones d'inhibition intéressantes pour les bactéries entre 10-15mm en Algérie. Même dans tous les pays de monde, ces activités étaient remarquables contre la plupart des souches testées avec des diamètres d'inhibition variable selon les souches et la concentration en HE.

Conclusion

Cette étude pourrait être considérée comme une source qui nous a permis de surveiller une mine d'informations liées aux composants de l'huile, ses différentes propriétés et son utilisation thérapeutique et industrielle, donc le travail nécessite plus de recherches scientifiques empiriques pour examiner l'application de cette huile dans le domaine thérapeutique pour une utilisation en toute sécurité. De plus, des tests phytochimiques supplémentaires *in vivo* sont nécessaires pour évaluer l'efficacité de l'huile, et donner plus de détails sur ses différentes activités biologiques potentielles comme antidiabétiques, anticoagulants, anti-inflammatoires, analgésique,... et ses mécanismes d'action.

Références bibliographiques

- Abou, N., Fareh, K. (2017).** Activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de *Mentha pulegium L.* mémoire de master en Biotechnologie et protection des végétaux, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.
- Ahmed Abd El Malek, N., Yagoubi, F. (2017).** Etude de l'Activité Antimicrobienne et Antioxydante des Huiles Essentielles de l'*Origanum Majorana L* de la Région d'Ain Defla. Mémoire de Master en génie des procédés, Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana.
- Aiboud, K. (2012).** Etude de l'efficacité de quelques huiles essentielles à l'égard de la bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) et impacts des traitements sur la germination des graines de *Vigna unguiculata (L.) Walp.* Thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri. Tizi Ouzou.
- Alakbarov, F. (2003).** Aromatic herbal baths of the ancients. The Journal of the American Botanical Council, 57, 40-49.
- Aliannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I. B. (2001).** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. Journal of agricultural and food chemistry, 49(9), 4168-4170.
- Amar, M. H., El Wahab, M. A. (2013).** Comparative genetic study among *Origanum L.* plants grown in Egypt. J Bio Env Sci, 3, 208-222.
- Amarti, F., El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Farah, A., & Chaouch, A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. Phytothérapie, 9(3), 149.
- Anthoula, A. (2003).** La filière "Plante aromatique et médicinale. FAO Projet "Assistance au Recensement Agricole". Liban.
- Badee, A. Z. M., Moawad, R. K., ElNoketi, M. M., & Gouda, M. M. (2013).** Antioxidant and antimicrobial activities of marjoram (*Origanum majorana L.*) essential oil. J Appl Sci Res, 9, 1193-1201.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils—a review. Food and chemical toxicology, 46(2), 446-475.
- Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013).** Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. glandulosum Desf. at different phenological stages. Journal of medicinal food, 16(12), 1115-1120.
- Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., & Abdelouahid, D. E. (2008).** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. Phytothérapie, 6(3), 153-159.

- Bekka, F. (2009).** Effet des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum Desf.* et d'*Artemisia herba alba Asso.* sur des bactéries multirésistantes. Magister en Microbiologie Appliquée. Université Abderrahmane MIRA de Béjaia. Algérie.
- Bellal, S., Benameur, K., & Chalabi, S. (2019).** Contribution à l'étude phytochimique et de l'activité antimicrobienne de *Pulicaria odora*.
- Belmont, M. (2013).** *Lavandula angustifolia M., Lavandula latifolia M., Lavandula x intermedia E.*: études botaniques, chimiques et thérapeutiques. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Joseph Fourier.
- Bernaoui, Y., Louetri, K. (2018).** Caractérisation phytochimique du Genre *Origanum* et leur bioactivités. Mémoire de Master Académique en Sciences biologiques. Biochimie appliquée. Université Echahid Hamma Lakhdar -El Oued.
- Bessah, R., & Benyoussef, E. H. (2015).** La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Revue des Energies Renouvelables*, 18(3), 513-528.
- Betancourt, L., Phandanouvong, V., Patiño, R., Ariza-Nieto, C., & Afanador-Téllez, G. (2012).** Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of *Oregano* essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 59(1), 21-31.
- Bina, F., & Rahimi, R. (2017).** *Sweet marjoram*: a review of ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(1), 175-185.
- Bouhekrit, M. (2018).** Étude de la composition chimique et de l'activité biologique des huiles essentielles de deux *Apiaceae elaeoselinum asclepium (L.) Bertol.* et *Margotia gummifera (Desf.) Lange*. Thèse de doctorat en Sciences. Université Ferhat ABBAS - Sétif 1. <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/1149>.
- Boudjouref, M. (2011).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris L.* magistère en biochimie, Université Ferhat Abbas-Setif.
- Bouhadouda, N. (2016).** Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local: *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*. Diplôme de Doctorat, Univ Badji Mokhtar, Annaba.
- Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S. et Abrini J., 2006.** *Thymus* essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc, 09-12 Mai 2006.
- Boukhatem, M. N., Hamaidi, M. S., Saidi, F., & Hakim, Y. (2010).** Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du *Géranium Rosat (Pelargonium graveolens L.)* cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature & Technology*, (3), 37.
- Boutlelis, D. A., & Bordjiba, O. (2014).** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du *Marrube blanc* ou *Marrubium vulgare L.* Thèse de doctorat en science, Université Badji mokhtar. Annaba.

Bouzabata, A. (2015). Contribution a l'étude d'une plante médicinale et aromatique *myrtus communis l.* thèse de doctorat en Sciences pharmaceutiques. Faculté de Médecine, Université Badji-Mokhtar, Annaba.

Carović-Stanko, K., Petek, M., Martina, G., Pintar, J., Bedeković, D., Ćustić, M. H., & Šatović, Z. (2016). Medicinal Plants of the Family *Lamiaceae*as Functional Foods—a Review. Czech journal of food sciences, 34(5), 377.

Charai, M., Mosaddak, M., & Faid, M. (1996). Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana L.* and *O. compactum Benth.* Journal of Essential Oil Research, 8(6), 657-664.

Chaves, RdSB., Martins, RL., Rodrigues, ABL., Rabelo, ÉdM., Farias, ALF., Brandão, LB., ... & de Almeida, SSMDS. (2020). Evaluation of larvicidal potential against *larvae of Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and of the antimicrobial activity of essential oil obtained from the leaves of *Origanum majorana L.* Plos one, 15(7), e0235740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235740>.

Chenna, A., Ahmedi, R., & Chefrour, A. (2018). Physico-chemical characterization of the essential oil of *Origanum majorana (L.)* cultivated in a semi-arid bioclimatic stage (South-east Algeria). Journal of Fundamental and Applied Sciences, 10(2), 396-406.

Chevalier, A. (1938). La Marjolaine vraie (*Majorana hortensis*) et sa culture. Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée, 18(204), 593-604.

Chikhoun, A. (2007). Huiles essentielles de *thym* et d'*Origan* étude de composition, de l'activité antioxydant antimicrobienne. Mémoire de magister. Institut nationale agronomique, El Harrach- Alger.

Chishti, S., Kaloo, Z. A., & Sultan, P. (2013). Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. J. Pharmacogn. Phytother, 5(10), 170-177.

Daoudi-Merbah, F. and Dahmani-Megrerouche, M. (2013). Contribution à la caractérisation de la niche écologique d'espece menacée : Elément pour sa conservation et sa valorisation. USTHB-FBS-4th International Congress of the Populations & Animal Communities "Dynamics & Biodiversity of the terrestrial & aquatic Ecosystems""CIPCA4"TAGHIT (Bechar), Algeria.

De Falco, E., Mancini, E., Roscigno, G., Mignola, E., Tagliatela-Scafati, O., & Senatore, F. (2013). Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum vulgare L. subsp. vulgare L.* under different growth conditions. Molecules, 18(12), 14948-14960.

Deans, S. G., & Svoboda, K. P. (1990). The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana L.*) volatile oil. Flavour and fragrance journal, 5(3), 187-190.

Deshmane, D. N., Gadgoli, C. H., & Halade, G. V. (2007). Anticonvulsant effect of *Origanum majorana L.* Pharmacologyonline, 1, 64-78.

Desmares, C., Laurent, A., & Delerme, C. (2008). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles: Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits

cosmétiques contenant des huiles essentielles. Saint-Denis cedex: Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSPS), 17p.

Deuschle, R. A. N., Deuschle, V. C. K. N., Bonfanti-Azzolin, G., de Oliveira, J. S., Sostisso, Q. C. B., dos Santos Goulart, J., ... & Golle, D. P. (2018). Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of *Origanum majorana* Against Oxidative Stress Biomarkers. *Journal of Agricultural Science*, 10(12).

Diallo, I. (2019). Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de *Lentinula edodes* (*Shiitake*) sous différentes conditions de culture. Doctoral dissertation, Université Montpellier.

Dontha, S. (2016). A review on antioxidant methods. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*, 9(2), 14-32. <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13092>.

El Amri, J., Elbadaoui, K., Zair, T., Bouharb, H., Chakir, S., & Alaoui, T. I. (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*, 82, 7481-7492.

El Ashmawy, I. M., Saleh, A., & Salama, O. M. (2007). Effects of *marjoram* volatile oil and *grape* seed extract on ethanol toxicity in male rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 101(5), 320-327.

El Idrissi, M., & Amechrouq, A. (2014). Chemical composition and biological activity of essential oils of *Organum majorana* L.(Lamiaceae) and *savia officinalis* (L).(Lamiaceae) against bruchus lentis (*Coleoptera chrysomelidae*). *Global journal of Pur and Applied Chemistry Research*, Vol. 2 (2), pp. 15-25.

Erenler, R., Sen, O., Aksit, H., Demirtas, I., Yaglioglu, A. S., Elmastas, M., & Telci, İ. (2016). Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(3), 822-836.

Figueredo, G. (2007). Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de doctorat. Chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.

Fyad, K., Cheriti, A., Bourmita, Y., & Belboukhari, N. (2013). *PhytoChem & BioSub Journal*. PCBS Journal, 35.

Gramza-Michalowska, A., Abramowski, Z., Jovel, E., & Hes, M. (2008). Antioxidant potential of herbs extracts and impact on *HEPG2* cells viability. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 7(4), 61-72.

Guerra-Boone, L., Alvarez-Román, R., Salazar-Aranda, R., Torres-Cirio, A., Rivas-Galindo, V. M., Waksman de Torres, N., ... & Pérez-López, L. A. (2015). Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 28.

- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53.
- Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2016).** Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana L.* essential oil. *Microbial Pathogenesis*, 95, 86-94.
- Hameurlaine, S., Gherraf, N. (2009).** Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *Pituranthos scoparius* et *Rhantherium adpressum* de la région de Ghardaïa. *Magister en Chimie Organique. Université de Kasdi Merbah –Ouargla.*
- Hanana, M., Mansour, M. B., Algabr, M., Amri, I., Gargouri, S., Romane, A., ... & Hamrouni, L. (2017).** Potential Use of Essential oils from Four Tunisian Species of *Lamiaceae*: Biological Alternative for Fungal and Weed Control. *Records of Natural Products*, 11(3).
- Hazzit, M. (2008).** Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de *thym* et *d'origan* poussant en Algérie. Thèse de doctorat en chimie. Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Bab ezzouar.
- Hussain, A. I. (2009).** Characterization and biological activities of essential oils of some species of *Lamiaceae*. Doctoral dissertation, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Rasheed, S., Nigam, P. S., Janneh, O., & Sarker, S. D. (2011).** Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(6), 943-952.
- Ietswaart, J. H., & Ietswaart, J. H. (1980).** A taxonomic revision of the genus *Origanum* (*Labiatae*) (1e éd.). (Vol. 4, p. 158). The Hague: Leiden University Press. (Page 17, 84).
- Iserin, P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2nd edition, Dorling Kindersley Limited, Londres. Page 241.
- Ismaili, R., Houbairi, S., Sanâa, L., Khadija, M., & Abdeslam, L. (2017).** Etude de l'Activité Antioxydante Des huiles Essentielles de Plantes Aromatiques et médicinales Marocaines. *European Scientific Journal*, ESJ, 13(12), 323.
- Kabera, J., Koumaglo, K. H., Ntezurubanza, L., Ingabire, M. G., & Kamagaju, L. (2005).** Caractérisation des huiles essentielles d'*Hyptis spicigera Lam.*, *Pluchea ovalis (Pers.) DC.* et *Laggeta aurita (LF) Benth. Ex. CB Clarke*, plantes aromatiques tropicales. *Etudes rwandaises*, 10, 7-18.
- Kahouli, I. (2010).** Effet antioxydant d'extraits de plantes (*Laurus nobilis L.*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Oléa Europea L.*) dans l'huile de *canola* chauffée.
- Kechar, K., & Hellal, B. (2017).** Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Ballota hirsuta Benth.* du Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*, 15(4), 217-221.

Kholkhal, F. (2014). Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus ssp coloratus et ssp euciliatus*. Thèse de Doctorat en Biologie. Université abou bekr belkaid, Tlemcen.

Kpadonou, D., Allanto, F., Kpadonou-Kpoviessi, B., Agbani, P., Gbaguidi, F., Baba-Moussa, L., ... & Kpoviessi, S. (2019). Relations entre composition chimique, activité antioxydante et toxicité des huiles essentielles de deux espèces de *Cymbopogon* acclimatées au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(2), 1201-1209.

Krishnakumar, V. & S. N. Potty. (2012). Central Plantation Crops Research Institute (ICAR), India. in Peter, K. V. (Ed.). *Handbook of herbs and spices*. Elsevier. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 227. 2nd éd. vol 1. Page 336.

Labioud, R. (2016). Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta*: activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide Thèse de doctorat en Biochimie appliqué, Université Badji Mokhtar. Annaba.

Lagha, R., Ben Abdallah, F., Al-Sarhan, B. O., & Al-Sodany, Y. (2019). Antibacterial and biofilm inhibitory activity of medicinal plant essential oils against *Escherichia coli* isolated from UTI patients. *Molecules*, 24(6), 1161.

Laghouiter, O. K., Gherib, A., & Laghouiter, H. (2015). Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de certaines *menthes* cultivées dans la région de Ghardaïa. *Revue El Wahat pour les Recherches et les Etudes* Vol, 8(1), 84-93.

Lakhrissi B., Boukhraz A., Barrahi M., El Hartiti H., Ouhssine M.(2016). Antifungal activity of essential oil of *oregano (origanum vulgare)*, *marjoram (origanum majorana)* and synergy of two essential oils against *candida albicans*. *International journal of research studies in science, engineering and technology.*, 3(12)., pp14-17.

Lamamra, M. (2018). Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *tinguarras sicala (L.) Parl* et de *Filipendula hexapetala Gibb*. Magistère. Université Ferhat abbas-Setif.

Likibi, B. N., Tsiba, G., Mabika, A. B. M., Etou, A. W., Ossibi, S. N., & Ouamba, J. M. (2019). Composés carbonylés majeurs et indices physico-chimiques des huiles essentielles de deux espèces du genre *Cymbopogon (Poaceae)* du Congo-Brazzaville. *International Journal of Engineering and Applied Sciences (IJEAS)*. Volume-6, Issue-10.

Mahfouf, N. (2018). Étude de l'espèce *Origanum vulgare L.* Thèse de doctorat en Écotoxicologie, Environnement et Santé. Université Chadli Benjedid - El Tarf, Algérie.

Makhloufi, A. (2010). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens (Desf.)* et *Rosmarinus officinalis L*) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat en biologie, université Aboubaker Belkaid, Tlemcen.

Maral, H., Türk, M., Çalışkan, T., & Kırıcı, S. (2017). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of six *Lamiaceae* plants growing in Southern Turkey. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 4(4), 62-68.

Mechergui, K., Coelho, J. A., Serra, M. C., Lamine, S. B., Boukhchina, S., & Khouja, M. L. (2010). Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1745-1749.

Medjahed, A., & Ouanoughi, A. (2019). Effet de l'extrait d'*origan* sur la morphométrie intestinale et certains paramètres hématobiochimiques chez la dinde de chair (*Meleagris gallopavo*) dans la région de M'sila. Thèse de doctorat, Université Mohamed Boudiaf, M'Sila.

Mnayer, D. (2014). Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. Thèse de doctorat en chimie. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.

Mohamdi Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. magistère en biologie, Université Abou Bakar Bel Kaid Tlemcen, p105.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.

Mossa, A. T. H., & Nawwar, G. A. M. (2011). Free radical scavenging and antiacetylcholinesterase activities of *Origanum majorana* L. essential oil. *Human & experimental toxicology*, 30(10), 1501-1513.

Moussaid, M., Elamrani, A. A., Berhal, C., Moussaid, H., Bourhim, N., & Benaissa, M. (2012). Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the *Lamiaceae* family: *Marrubium vulgare* (L.) and *Origanum majorana* (L.). *Int J Nat Prod Res*, 1(1), 11-13.

Moussaoui, S., Talit, N. (2016). Association des composés phénoliques de quelques plantes médicinales. Mémoire de master, Université A. MIRA. Bejaia.

Nieto, G. (2017). Biological activities of three essential oils of the *Lamiaceae* family. *Medicines*, 4(3), 63.

Nurzyńska-Wierdak, R., Zawislak, G., & Kowalski, R. (2015). The Content and composition of essential oil of *Origanum majorana* L. grown in Poland depending on harvest time and method of raw material preparation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(6), 1482-1489.

Paolini, J. (2005). Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM (IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux *Asteraceae* endémiques de Corse: *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*. Thèse de doctorat en Chimie organique et analytique. Université De Corse.

- Partovi, R., Talebi, F., & Sharifzadeh, A. (2018).** Antimicrobial Efficacy and Chemical Properties of *Caryophyllus aromaticus* and *Origanum majorana* Essential Oils Against Foodborne Bacteria Alone and in Combination. *Int J Enteric Pathog*, 6(4), 95-103.
- Piochon, M. (2008).** Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Université du Québec à Chicoutimi.
- Poirot, T. (2016).** Bon usage des huiles essentielles, effets indésirables et toxicologie. Thèse de doctorat en Pharmacie, Faculté de Pharmacie. Université de Lorraine. Essey-lès-Nancy.
- Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2010).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, 4, 25-39. <http://www.revue-genie-industriel.info>.
- Prakash, B., Singh, P., Kedia, A., & Dubey, N. K. (2012).** Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. *Food Research International*, 49(1), 201-208.
- Ramadan, M. F. (2010).** Rapid antiradical method for screening deep fried oils. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5(1), 47-50.
- Ramos, S., Rojas, L. B., Lucena, M. E., Meccia, G., & Usubillaga, A. (2011).** Chemical composition and antibacterial activity of *Origanum majorana L.* essential oil from the venezuelan Andes. *Journal of essential oil research*, 23(5), 45-49.
- Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., ... & Özer, H. (2004).** Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food control*, 15(7), 549-557.
- Sakkas, H., & Papadopoulou, C. (2017).** Antimicrobial activity of *basil*, *oregano*, and *thyme* essential oils. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(3), 429-438.
- Şarer, E., Scheffer, J. J. C., & Svendsen, A. B. (1982).** Monoterpenes in the essential oil of *Origanum majorana*. *Planta medica*, 46(12), 236-239.
- Sari, M. (2018).** Étude biologique et phytochimique de l'*origan Origanum vulgare L. ssp glandulosum Desf.* Letswaart) espèce endémique d'Algérie-Tunisie. Thèse de doctorat en sciences, université Ferhat Abbas, Setif.
- Seddik, M. (2010).** Analyse physico-chimique, chromatographique et spectroscopique de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* de la région d'Adrar: Etude de son activité biologique et anti-oxydante. Magistère en Chimie Moléculaire, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella.
- Sedlaříková, J., Doležalová, M., Egner, P., Pavlačková, J., Krejčí, J., Rudolf, O., & Peer, P. (2017).** Effect of *oregano* and *marjoram* essential oils on the physical and antimicrobial properties of chitosan based systems. *International Journal of Polymer Science*.

- Semiz, G., Semiz, A., & Mercan-Doğan, N. (2018).** Essential oil composition, total phenolic content, antioxidant and antibiofilm activities of four *Origanum* species from southeastern Turkey. *International journal of food properties*, 21(1), 194-204.
- Soliman, F. M., Yousif, M. F., Zaghoul, S. S., & Okba, M. M. (2009).** Seasonal variation in the essential oil composition of *Origanum majorana* L. cultivated in Egypt. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64(9-10), 611-614.
- Soulet, M. (2017).** Les pathologies buccales: conseils et alternatives en aromathérapie: enquête au sein des officines du Poitou Charentes. Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Poitiers.
- Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2007).** Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *Journal of ethnopharmacology*, 110(1), 105-117.
- Taleb-Toudert K. (2015).** Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur le bruché de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : bruchidae). Thèse de Doctorat en sciences biologiques. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.
- Toure, D. (2015).** Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat en biologie humaine tropicale, Chimie organique. Université Felix Houphouët, Boigny, Côte d'Ivoire.
- Tripathy, B., Satyanarayana, S., Abedulla Khan, K., & Raja, K. (2017).** An Updated Review on Traditional Uses, Taxonomy, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Origanum majorana*. *Int. J. Pharma Res. Health Sci*, 5, 1717-1723.
- Vagi, E., Rapavi, E., Hadolin, M., Vasarhelyine Peredi, K., Balazs, A., Blazovics, A., & Simándi, B. (2005).** Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(1), 17-21.
- Vági, E., Simándi, B., Suhajda, A., & Hethelyi, E. (2005).** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food research international*, 38(1), 51-57.
- Vasudeva, N. & Goel, P (2015).** *Origanum majorana* L.-Phyto-pharmacological review. *Origanum majorana* L. -Phyto-pharmacological review. Department of Pharmaceutical Sciences, Guru Jambheshwar University of Science and Technology, Hisar, Haryana, India. *Indian Journal of Natural Products and Resources* Vol. 6(4), December 2015 pp. 261-267.
- Vazirian, M., Mohammadi, M., Farzaei, M. H., Amin, G., & Amanzadeh, Y. (2015).** Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* essential oil from Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*, 2(1), 41-46.
- Vera, R. R., & Chane-Ming, J. (1999).** Chemical composition of the essential oil of *marjoram* (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. *Food Chemistry*, 66(2), 143-145.

Waller, S. B., Madrid, I. M., Ferraz, V., Picoli, T., Cleff, M. B., de Faria, R. O., ... & de Mello, J. R. B. (2016). Cytotoxicity and anti-Sporothrix brasiliensis activity of the *Origanum majorana* Linn. oil. Brazilian journal of microbiology, 47(4), 896-901.

Wollinger, A., Perrin, E., Chahboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., & Kunz, W. (2016). Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. Comptes Rendus Chimie, 19(6), 754-765.

Zeghad N. (2009). Etude de contenu polynolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*thymus vulgaris*, *Rosamariuns officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Université Mentouri, Constantine.

Zekri, N. (2017). Étude Phytochimique et Activités Biologiques des Huiles Essentielles et des Extraits des *M. pulegium* (L.), *M. suaveolens* (Ehrh.), et *M. spicata* (L.) du Moyen-Atlas Marocain. Thèse de doctorat en chimie, université de Mohammed V. rabat.

