

République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة جيلالي بونعاما

Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana  
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre  
Département des Sciences Biologiques



*Mémoire de fin d'études*

En vue de l'obtention de diplôme de **Master** en

**Domaine** : Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière** : Biotechnologie

**Spécialité** : Biotechnologie microbienne

## Valorisation par voie biotechnologique de quelques espèces végétales d'intérêt médicinaux

**Présenté par :**

- Melle Refigui Imene
- Melle Medani Widad

**Devant le jury :**

Mme Sassoui D.	MCB	Présidente	(U.D.B Khemis Miliana)
Mr Lazali M.	Prf	Encadreur	(U.D.B. Khemis Miliana)
Mme Douaouri N.H.	MCB	Co-encadreur	(U.D.B Khemis Miliana)
Mme Benazzouk S.	MAB	Examinatrice	(U.D.B Khemis Miliana)

**Année universitaire 2021/2022**

## **REMERCIEMENTS**

*Au Nom de Dieu le Très Miséricordieux, le Tout Miséricordieux, Que Dieu bénisse le Prophète Mohamed, Imam des Bienheureux et Sauvegarde des Purifiés ainsi que Sa Noble*

*Famille et ses Satisfaisants Compagnons-Amin.*

*Nous rendons grâce à Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé, le courage et la force de mener ce travail à bout.*

*Nous tenons tout d'abord un grand merci à notre promotrice **Mme DOUAOURI NOR EL HOUDA** pour la disponibilité, la confiance, les conseils, l'encadrement, la patience de correction et le soutien moral qu'elle a su nous apporter tout au long du travail.*

*Nous tenons également à la remercier de toute la patience dont elle a su faire preuve au cours de la rédaction de notre mémoire.*

*Nous tenons à remercier notre responsable de filière **Mr LAZALI MOHAMED**, Professeur à l'Université de Khemis-Miliana Djilali Bounaama.*

*Nous tenons à remercier **Mme. SASSOU D**, d'avoir accepté la présidence du jury de notre travail, qu'elle trouve ici toutes les expressions de nos sentiments respectueux.*

*Nous tenons à remercier **Mme. BENZAOUK S**, d'avoir accepté de faire partie du jury pour examiner notre modeste travail.*

*Nous remercions nos collègues de toute la promo de **Biotechnologie Microbienne** et nos amies pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble.*

*Nous remercions en fin tous ceux qui n'ont pas été cités dans ces quelques lignes et qui ont contribué de près ou de loin par leur aide au bon déroulement de ce travail.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mon père **Mohamed**, qui sera fier de moi, mon père qui m'a soutenu durant ces années d'études. J'apprécie vos sacrifices qui m'aider à avancer.*

*Ma mère **Fatíha**, aucun mot, aucun dédicace ne pourrait exprimer mon respect voici le fruit de votre encouragement ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour.*

*Mes grands-pères et mes grands-mères*

*Mon cher frère **Aymen** qui m'a réconforté.*

*Mes chères sœurs **Sarah** et **Hadjer** merci pour votre soutien morales et là pour moi.*

*Mon fiancé **Azzedine** pour son soutien bien sûr il y a des sentiments qui ne peuvent être exprimés avec des mots mais je garde ton amour au plus profond de mon cœur. Puisse Allah fortifier notre amour.*

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

*Mes cousins et mes cousines.*

*Ma chère **Widad** avec qui j'ai partagé les bons et les durs moments difficiles de ce travail.*

*Mes chères amies **Meriem**, **Houda**, **Selma**, **Soumia**, **Menal**, **Fatíha** et **Ghada** pour leurs aides et supports dans les moments difficiles et tous mes amies de la promotion Master de biotechnologie microbienne 2022. Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.*

***Imene***

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail*

***Aux êtres les plus chers : Mes parents,***

*Qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et souci de tendresse et d'affection, que dieu leur procure bonne santé et longue vie et en espérant que ce travail sera digne de leurs espoirs et de leur confiance.*

***A ma très chère mère***

*Celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation avec ses prières et son amour*

***A mon cher père,***

*Pour son amour, ses précieux conseils et ses sacrifices afin que rien n'entrave le déroulement de mes études*

***A mon cher frère Hichem,***

*Qui m'a toujours aimé, et qui a hâte d'attendre mes félicitations  
Avec tout mon amour et ma tendresse*

***À mes très chères sœurs,***

*Nabila, et Manel, que j'aime beaucoup, qui ont été toujours là à mes côtés, qui m'ont aidé en toute étape de ma vie.*

***A mes beaux-frères : Younes et Abd El Waheb***

***A ma belle-sœur : Imene***

***A ma tendre nièce Katr El Nada et mon cher neveu Abd Elrahmen***

*À qui j'ai beaucoup d'affection et d'amour. Je leur souhaite de grandir tout en réalisant des exploits dignes et leurs ambitions par leurs brillantes intelligences.  
A toutes mes tantes, mes oncles, cousins, et mes chères cousines ainsi toute la grande famille*

***A mes chère grand parent que dieu les protèges***

*A mon binôme Imene qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail.*

***Et sans oublier*** A tous mes amis et collègues de la promo et A tous ceux qui m'aiment...

*Widad*

## Résumé

Cette étude a pour objectif la valorisation des plantes médicinales aromatiques, par la caractérisation de deux espèces végétales poussant à l'état spontané au nord-ouest de l'Algérie à savoir « *Origanum majorana* L. » et « *Mentha spicata* », à travers la composition chimique des huiles essentielles et l'évaluation de leurs propriétés biologiques.

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation, a donné des rendements de 1.493% pour l'huile essentielle de l'*Origanum majorana* et de 1.208% pour l'huile essentielle de *Mentha spicata*.

L'analyse chromatographique par CPG-SM a indiqué que les composés majeurs étaient D-(+) Carvone (67.61%),  $\gamma$ -Terpinene (13.12%), O-Acetylthymol (6.80%) et *p*-cymene (3.44%) pour l'HE de l'*O. majorana*. Alors que la composition chimique de l'HE de *Mentha spicata* est dominée par D-(+)-carvone (43.05%), neo-iso-dihydrocarveol (8.53 %), limonène (6.68%), transcarveol (4.84%), D-Germacrene (4.93%), et l'eucalyptol (4.51%).

Une considérable activité antioxydante des huiles essentielles a été révélée par l'utilisation de la méthode du piégeage du radical libre DPPH. L'HE de marjolaine a présenté un important pouvoir antioxydant qui se traduit par la valeur de l'IC50 de l'ordre de 0.025 mg/ml, comparativement à l'acide ascorbique (0.028mg/ml).

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum majorana* et *Mentha spicata* sur trois souches bactériennes de référence (*Staphylococcus aureus* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) par la technique d'aromatogramme a montré que le pouvoir antibactérien de ces huiles est très important et se caractérise par une action bactéricide contre les germes suscités.

**Mots clés :** *Origanum majorana* L., *Mentha spicata*, Hydrodistillation, CPG-SM, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

## ملخص

هذه الدراسة الى تميم النباتات الطبية العطرية، من خلال وصف نوعين من النباتات ينموان في الحالة التلقائية في شمال غرب الجزائر وهما *Origanum majorana* , *Mentha spicata* من خلال التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية وتقييم خصائصها البيولوجية.

اعطى استخلاص الزيوت العطرية بالتقطير المائي عائد ٪ 1.493 للزيت العطري ل *Origanum majorana* و ٪ 1.208 بالنسبة لزيوت العطري ل *Mentha spicata*.

اشارت التحاليل الكروماتوغرافية عن CPG-SM الى ان المركبات الرئيسية كانت D-(+) Carvone (67.61%)،  $\gamma$ -Terpinene (13.12%)، O-Acetylthymol (6.80%)،  $\rho$ -cymene (3.44%) لزيوت العطري ل *Origanum majorana* اما بالنسبة ل *Mentha spicata* بينما التحليل الكيميائي لزيوت العطري ل *Mentha spicata* أظهرت وجود carvone (43.05%)، *neo-iso-dihydrocarveol* (8.53 %)، limonène (6.68%)، transcarveol (4.84%)، Eucalyptol (4.51%)، D-Germacrene (4.93%)

تم الكشف عن نشاط كبير لمضادات الاكسدة للزيوت الأساسية باستخدام طريقة الجذور الحرة DPPH قدم زيت البردقوش العطري قوة كبيرة من مضادات الاكسدة التي تنعكس من خلال قيمة IC50 لتركيب 0.025 مجم/مل، مقارنة بحمض الاسكوربيك ( 0.028 مجم/مل).

أظهرت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت العطرية من *Origanum majorana* و *Mentha spicata* على ثلاث سلالات بكتيرية مرجعية (*Staphylococcus aureus* ATCC 27853 و *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) بواسطة تقنية التصوير العطري أن القوة المضادة للبكتيريا لهذه الزيوت هي مهم جدا ويتميز بعمل مبيد للجراثيم ضد الجراثيم المثارة.

**الكلمات المفتاحية:** *Origanum majorana* ، *Mentha spicata* ، CPG/MS ، التقطير ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للمكروبات

## Abstract

This study aims to promote aromatic medicinal plants, through the characterization of two plant species growing spontaneously in the north-west of Algeria, namely “*Origanum majorana* L” and “*Mentha spicata*”, through the chemical composition of essential oils and evaluation of their biological properties.

The extraction of essential oils by hydrodistillation gave yields of 1.493% for the essential oil of *Origanum majorana* and 1.208% for the essential oil of *Mentha spicata*.

Chromatographic analysis by GC-MS indicated that the major compounds were D-(+) Carvone (67.61%),  $\gamma$ -Terpinene (13.12%), O-Acetylthymol (6.80%) and p-cymene (3.44%) for the HE of the *O. majorana*. While the chemical composition of *Mentha spicata* HE is dominated by D-(+)-carvone (43.05%), neo-iso-dihydrocarveol (8.53%), limonene (6.68%), transcarveol (4.84%), D –Germacrene (4.93%), and eucalyptol (4.51%).

Considerable antioxidant activity of essential oils was revealed by using the DPPH free radical scavenging method. The essential oil of marjoram presented a significant antioxidant power which is reflected by the value of the IC<sub>50</sub> of the order of 0.025 mg/ml, compared to ascorbic acid (0.028mg/ml).

The study of the antibacterial activity of the essential oils of *Origanum majorana* and *Mentha spicata* on three reference bacterial strains (Staphylococcus aureus ATCC 27853, Escherichia coli ATCC 25922 and Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853) by the aromatogram technique showed that the antibacterial power of these oils is very important and is characterized by a bactericidal action against the germs aroused.

**Key words:** *Origanum majorana*, *Mentha spicata*, Hydrodistillation, GC-MS, antioxidant activity, antimicrobial activity.

## Tables des matières

<b>Remerciements</b>	
<b>Dédicaces</b>	
<b>Resumé</b>	
<b>ملخص</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des abréviations et symboles</b>	
<b>Introduction générale .....</b>	<b>01</b>
<b>Partie I. Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I. Généralités sur les huiles essentielles.....</b>	<b>04</b>
I.1 Les huiles essentielles .....	05
I.1.1. Définition des huiles essentielles.....	05
I.1.2. Composition et constituants chimiques des huiles essentielles.....	05
I.1.3. Localisation des huiles essentielles dans la plante.....	07
I.1.4. Toxicité des huiles essentielles.....	07
I.1.5. Utilisation des huiles essentielles.....	08
I.1.5.1. En industrie agroalimentaire.....	08
I.1.5.2. Pharmacie et Aromathérapie.....	08
I.1.6. Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	09
I.1.6.1. Entraînement à la vapeur d'eau.....	09
I.1.6.2. Hydrodistillation.....	10
I.1.6.3. Extraction par micro-ondes.....	11
I.1.6.4. Extraction par les solvants et extraction au CO <sub>2</sub> .....	11
<b>Chapitre II. Monographie des plantes étudiées .....</b>	<b>12</b>
I.2. Présentation des plantes étudiées.....	13
I.2.1. <i>Origanum majorana</i> L. ....	13
I.2.1.1. Historique.....	13

I.2.1.2. Origine et aire de répartition.....	13
I.2.1.3. Description botanique.....	14
I.2.1.4. Systématique.....	15
I.2.1.5. Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Origanum majorana</i> L.....	16
I.2.1.6. Utilisation et propriétés thérapeutiques de la marjolaine .....	17
<b>I.2.2. <i>Mentha spicata</i> L.....</b>	<b>21</b>
I.2.2.1. Origine et aire de répartition.....	21
I.2.2.2. Description botanique.....	21
I.2.2.3. Systématique.....	22
I.2.2.4. Composition phytochimique d'huile essentielle de la menthe.....	23
I.2.2.5. Utilisation et propriétés thérapeutiques de la menthe.....	24
<b>Chapitre III. Activités biologiques des huiles essentielles .....</b>	<b>25</b>
I.3. Activité antioxydante.....	26
I.3.1 Le stress oxydant .....	26
I.3.2. Radicaux libres .....	26
I.3.3. Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species ROS).....	26
I.3.4. Production des radicaux libres .....	27
I.3.4.1. Production intracellulaire (endogène) .....	27
I.3.4.2 Production extracellulaire (exogène) .....	27
I.3.5. Les antioxydants).....	28
I.3.5.1. Définition.....	28
I.3.5.2. Types d'antioxydants.....	28
I.3.5.3. Mécanisme d'action des antioxydants.....	30
I.3.5.4. Utilisation des antioxydants.....	30
I.3.5.5. Activité antioxydante des huiles essentielles .....	30

I.4. Activités antibactériennes.....	31
I.4.1. Les huiles essentielles comme agents antibactériens.....	31
I.4.2. Mode d'action .....	32

## **Partie II. Matériels et méthodes, résultats et discussion**

II.1. Matériels.....	34
II.1.1. Matériel végétal.....	34
II.1.2. Souches microbiennes.....	35
II.1.3. Matériel non biologique.....	35
II.2. Méthodes.....	35
II.2.1 Traitements préliminaires des feuilles utilisées.....	35
II.2.1.1. Séchage et conservation.....	35
II.2.2. Screening phytochimique.....	36
II.2.2.1. Préparation des extraits aqueux.....	37
II.2.2.2. Caractérisation des principaux constituants chimiques.....	38
II.2.3. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	39
II.2.3.1 Conservation des huiles essentielles.....	40
II.2.3.2. Rendement des extractions .....	40
II.2.4. Caractérisation des huiles essentielles.....	41
II.2.4.1. Caractérisation organoleptique.....	41
II.2.4.2. Détermination des propriétés physico-chimiques.....	41
II.2.4.2.1. Les propriétés physiques.....	41
II.2.5. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles.....	42
II.2.5.1 Analyse de composition chimique des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).....	43
II.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles .....	44

II.4. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles par le test de DPPH.....	46
--	----

### **III. Résultats et discussion**

III.1. Screening phytochimique .....	49
III.2. Rendements des huiles essentielles .....	50
III.3. Caractérisation des huiles essentielles.....	50
III.3.1. Caractéristiques organoleptiques.....	51
III.3.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	52
III.4. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par CPGMS.....	54
III.4.1. Analyse de l'huile essentielle de l'origan (marjolaine) par CPGMS.....	54
III.4.2. Analyse de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> L. par CPGMS.....	58
III.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles .....	64
III.5.1. Résultats de l'aromatogramme.....	64
III. 6. Evaluation de l'activité antioxydante in vitro par le test de DPPH .....	68

### **IV. Conclusion générale**

#### **Références bibliographiques**

#### **Annexes**

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b>	Position systématique de l' <i>Origanum majorana</i> L.	15
<b>Tableau 02</b>	Utilisations ethnomédicinales d' <i>O. majorana</i>	19
<b>Tableau 03</b>	Taxonomie de <i>Mentha spicata</i> L	22
<b>Tableau 04</b>	Composition biochimique de <i>Mentha spicata</i> L	24
<b>Tableau 05</b>	Les principales espèces réactives de l'oxygène générées dans les systèmes biologiques	27
<b>Tableau 06</b>	Principaux antioxydants naturels et sources alimentaires associées.	29
<b>Tableau 07</b>	Les résultats du screening phytochimique	49
<b>Tableau 08</b>	Rendements en huiles essentielles en Algérie et dans le monde	50
<b>Tableau 09</b>	Caractéristiques organoleptiques de nos huiles essentielles.	51
<b>Tableau 10</b>	Caractéristiques physico-chimiques de nos huiles essentielles.	53
<b>Tableau 11</b>	Composants de l'HE d' <i>Origanum majorana</i> L	54
<b>Tableau 12</b>	Composition de l'HE de <i>Mentha spicata</i> L	58
<b>Tableau 13</b>	Résultat de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Origanum marjorana</i> et <i>Mentha spicata</i> en exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm	64

## Liste des figures

<b>Figure 01</b>	Les classes des constituants chimiques des huiles essentielles	6
<b>Figure 02</b>	Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	11
<b>Figure 03</b>	Plante d' <i>Origanum majorana</i> L	15
<b>Figure 04</b>	Structure de certains des principaux composés actifs d' <i>Origanum majorana</i>	17
<b>Figure 05</b>	Les parties aériennes de <i>Mentha spicata</i> L	22
<b>Figure 06</b>	Résumé des sources exogènes et endogènes de radicaux libres	28
<b>Figure 07</b>	les structures moléculaires d'antioxydants synthétiques.	29
<b>Figure 08</b>	Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne	32
<b>Figure 09</b>	Localisation des régions de la récolte des lamiacées étudiées	35
<b>Figure 10</b>	Le séchage des feuilles d' <i>Origanum majorana</i>	36
<b>Figure 11</b>	Les feuilles d' <i>Origanum</i> après le séchage	36
<b>Figure 12</b>	Séchage des plantes de la Menthe	36
<b>Figure 13</b>	Echantillon de la Menthe secs	36
<b>Figure 14</b>	Broyage des feuilles	37
<b>Figure 15</b>	Préparation de l'infusé	37
<b>Figure 16</b>	Filtration de l'infusé	37
<b>Figure 17</b>	Une masse de 50 g des feuilles sèches d'origan et de la menthe	37
<b>Figure 18</b>	Hydrodistillateur de type Clevenger	38
<b>Figure 19</b>	Illustration de la méthode d'aromatogramme	46
<b>Figure 20</b>	La forme radicale du DPPH et sa réduction par un antioxydant	47
<b>Figure 21</b>	Aspect des huiles essentielles des deux plantes <b>(a)</b> <i>Origanum majorana</i> et <b>(b)</b> <i>Mentha spicata</i>	52
<b>Figure 22</b>	Sensibilité des souches bactériennes Gram négatives testées vis-à-vis de l'huile essentielle de l' <i>Origanum majorana</i>	66
<b>Figure 23</b>	Sensibilité de la souche bactérienne Gram positif testée vis-à-vis de l'huile essentielle de l' <i>Origanum majorana</i>	67
<b>Figure 24</b>	Sensibilité des souches bactériennes Gram négatives testées vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i>	67

<b>Figure 25</b>	Sensibilité de la souche bactérienne Gram positif testée vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i>	68
<b>Figure 26</b>	Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique (vitamine C) par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.	68
<b>Figure 27</b>	Pouvoir antioxydant de l'HE <i>Origanum majorana</i> et l'HE <i>Mentha spicata</i> par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.	69
<b>Figure 28</b>	Concentration inhibitrice (IC50) de l'acide ascorbique, de l'HE de la marjolaine et l'HE de la Menthe	70

## Liste des abréviations

<b><i>O. majorana</i></b>	: <i>Origanum majorana</i>
<b><i>M.spicata</i></b>	: <i>Mentha spicata</i>
<b>%</b>	: Pourcentage
<b>µl</b>	: Microlitre
<b>µg</b>	: Microgramme
<b>AFNOR</b>	: Association Française de la Normalisation
<b>C°</b>	: Degré Celsius
<b>DMSO</b>	: Diméthyl sulfoxyde
<b>MH</b>	: Mueller Hinton
<b>HE</b>	: Huiles essentielles
<b>DPPH</b>	: 2, 2'-diphényl-1-picrylhydrazyle
<b>IC50</b>	: Concentration inhibitrice à 50% (IC50)
<b>IA</b>	: Indice d'acide
<b>IR</b>	: Indice de réfraction
<b>PH</b>	: Potentiel hydrogène
<b>EOR</b>	: Espèces réactives d'hydrogène
<b>CPG/SM</b>	: Chromatographie en phase gazeuse couplé par la spectrométrie de masse
<b>CPG</b>	: Chromatographie en phase gazeuse
<b>CO2</b>	: Dioxyde de Carbone
<b>FeCl3</b>	: Perchlorure de Fer
<b>NaOH</b>	: Hydroxyde de sodium
<b>HCL</b>	: Alcool Chlorhydrique
<b>H2SO4</b>	: Acide Sulfurique

<b>½ O<sub>2</sub></b>	: Oxygène singulet
<b>NO°</b>	: Monoxyde d'azote
<b>O°<sup>2-</sup></b>	: Radical superoxide
<b>OH°</b>	: Radical hydroxyl
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: Peroxynitrite
<b>RO°</b>	: Radicaux alkoxy
<b>ROO°</b>	: Radicaux peroxy
<b>mm</b>	: Millimètre
<b>g</b>	: Gramme
<b>ml</b>	: Millilitre
<b>UFC/ml</b>	: Unité formant colonie par millilitre
<b>Gram +</b>	: Gram positif
<b>Gram -</b>	: Gram négatif
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>DZI</b>	: Diamètre de zone d'inhibition
<b>V</b>	: Vent
<b>R %</b>	: Rendement exprimé en%

# Introduction générale

---

## **Introduction générale**

Les plantes ont constitué le premier et principal outil thérapeutique à la disposition de l'homme et ce, pendant de nombreux siècles. Dans diverses civilisations et sur tous les continents, les pharmacopées végétales se sont développées et enrichies grâce à l'empirisme. Avec un don d'observation inégalé, les anciens ont pu mettre en évidence des propriétés curatives ou préventives des plantes médicinales qui n'ont d'ailleurs, jamais été démenties par l'usage (**Carillon, 2009**).

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 (**Makhloufi, 2010 ; El Amri et al., 2014**). 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**).

En effet, les plantes médicinales sont devenues importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque leurs constituants sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse des médicaments (**Abdelli, 2017**).

Au-delà de nouvelles approches systématiques et scientifiques sont nécessaires pour le développement de médicaments actifs dérivés de plantes. De plus, l'extraction de grandes quantités de composés à partir de sources naturelles reste un défi et nécessite le développement de nouvelles approches biotechnologiques et de la synthèse organique totale. Malgré ces lacunes, les recherches actuelles suggèrent que les produits naturels représenteront probablement une source majeure de nouveaux médicaments dans le futur.

L'Algérie, de par sa situation géographique et son climat méditerranéen, est douée d'une flore très riche et diversifiée dont de nombreuses plantes médicinales qui sont toujours utilisées en médecine traditionnelle (**Quezel et Santa, 1963 ; Bab Aissa, 1999**). 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 cette famille sont bien connues pour leur rôle essentiel dans la production des huiles essentielles auxquelles leurs activités biologiques ont été attribuées (**Kechar et al., 2017; Sari, 2018**).

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore Algérienne et a pour but l'étude de deux espèces végétale à savoir, *Origanum majorana* et *Mentha spicata*.

Pour illustrer ces objectifs, notre étude sera structurée en deux grandes parties. Dans la première partie, une synthèse bibliographique va mettre en exergue trois chapitres. Le premier chapitre abordera les huiles essentielles de façon générale, le deuxième sera consacré y compris à la description botanique, la classification et à la composition chimiques des deux espèces végétales étudiées. Les activités antibactériennes et antioxydantes feront l'objet du troisième chapitre.

La partie expérimentale quant à elle sera subdivisée en deux chapitres, le premier présentera les matériels et les méthodes utilisés pour la réalisation de cette étude, à savoir :

- L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.
- La préparation et les analyses physico-chimiques des huiles essentielles d'*O. majorana* et de *M. spicata* ;
- Le criblage phytochimique des parties aériennes des plantes sélectionnées.
- La détermination de la composition chimique des huiles essentielles par CPG-SM.
- Une étude in vitro des effets thérapeutiques, par des tests biologiques ;
- L'évaluation de l'activité antioxydant par le test de DPPH
- L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de l'aromatogramme ;

Les résultats obtenus, suivis de la discussion feront l'objet du second. La conclusion et les perspectives ainsi que les références bibliographiques constitueront la dernière partie de notre manuscrit.

**Partie I**

---

**Synthèse bibliographique**

# **Chapitre I**

## *Les généralités sur les huiles essentielles*

## I.1 Les huiles essentielles

### I.1.1. Définition des huiles essentielles

Une huile essentielle appelée aussi essence, est un mélange complexe de substances aromatiques (**Muther, 2015**). En effet, elle renferme des métabolites secondaires volatils (**Rubiolo et al., 2010**). Selon l'Agence Française de Normalisation (**AFNOR NF T 75-006**), une huile essentielle est un « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche. L'huile est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (**AFNOR, 2000**).

La commission de la **Pharmacopée Européenne (01-2008 : 2028)**, a défini les huiles essentielles comme un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition.

Les huiles essentielles ont une faible solubilité dans l'eau, mais sont solubles dans les graisses, l'alcool, les solvants organiques et d'autres substances hydrophobes et sont généralement liquides à température ambiante, incolores ou jaunâtres, inflammables et s'altèrent facilement à l'air en se résinifiant (**Baser et Demirci, 2007 ; Li et al., 2014**).

### I.1.2. Composition et constituants chimiques des huiles essentielles

Les constituants chimiques des huiles essentielles (**Figure 01**) appartiennent exclusivement à deux groupes ayant chacun des origines biogénétiques distinctes à savoir les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Bruneton, 1999 ; Cheurfa, 2015**).

Les huiles essentielles peuvent également contenir divers produits résultant du processus de dégradation, y compris des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

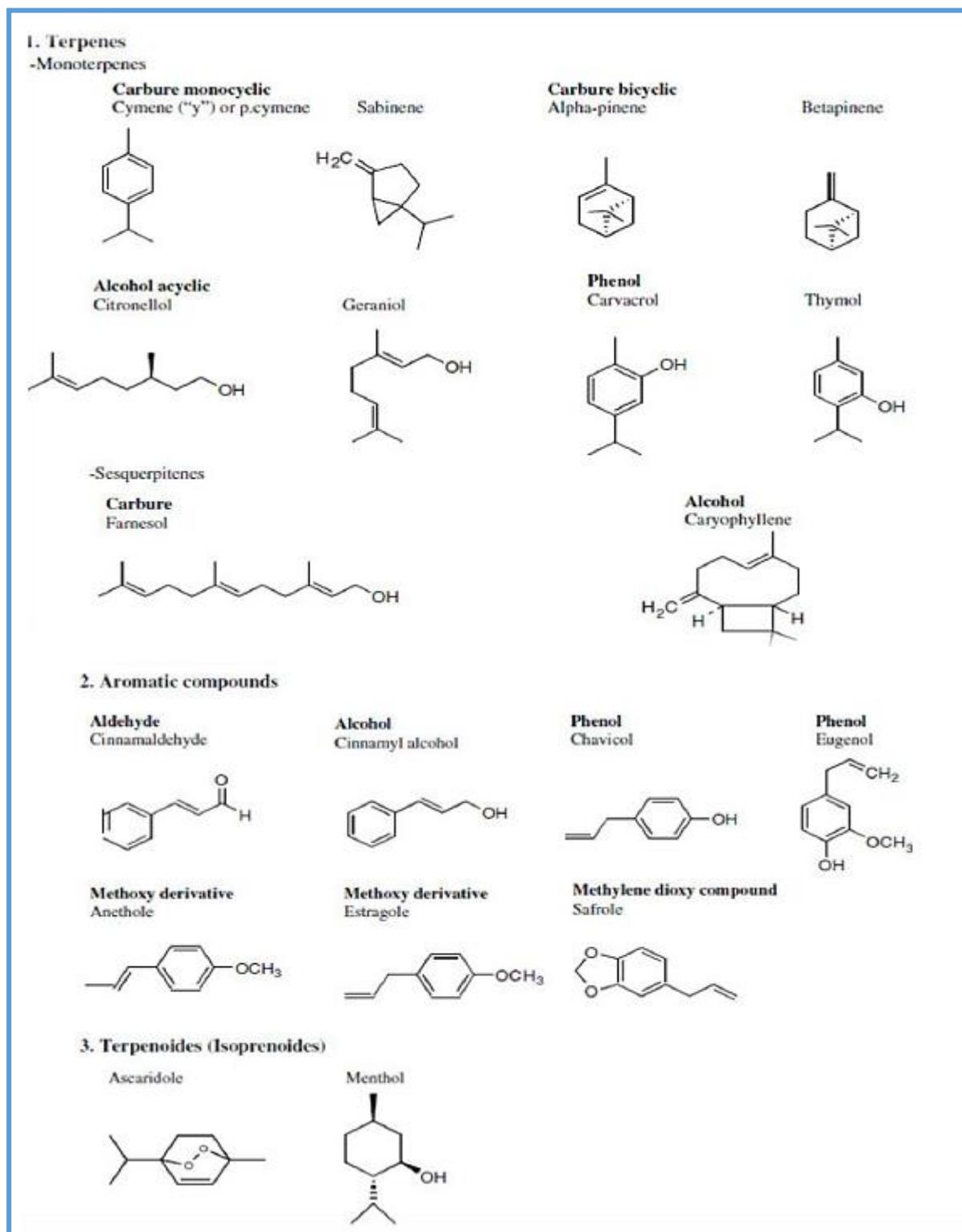


Figure 01 : Les principaux constituants chimiques des huiles essentielles (Touré, 2015).

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de

masse (CPG-SM). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (**Touré, 2015**).

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol, sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, les plus actifs. Aussi, il n'est pas étonnant de constater que les huiles essentielles riches en phénols, comme les huiles de thym, de *Corydothymus capitatus* et de *Syzygium aromaticum*, démontrent les plus hautes activités antibactériennes (**Touré, 2015**).

### **I.1.3. Localisation des huiles essentielles dans la plante**

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal, principalement chez les végétaux supérieurs. 17500 espèces aromatiques appartenant à un nombre limité de familles, dont les Lamiacées, les Lauracées, les Apiacées, les Astéracées et les Myrtacées (**Regnault-Roger et al., 2008 ; Ouis, 2015**).

Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en générale dans des cellules glandulaires spécialisées (**Touhami, 2017**). Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites à huiles essentielles (*Lauraceae*), des poils sécréteurs (*Lamiaceae*), des poches sécrétrices (*Myrtaceae*) et dans des canaux sécréteurs (*Asteraceae*) (**Bouزيد, 2018**). Elles peuvent être extraites de divers organes végétaux tels que les fleurs (camomille, lavande), les feuilles (citronnelle, eucalyptus), les racines (vétiver), les fruits (anis, badiane), les rhizomes (curcuma, gingembre), le bois (bois de rose, santal) ou graines (muscade) (**Laurent, 2017**).

Il est intéressant de citer que les organes d'une même espèce, peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon leurs localisations dans la plante (**Figueredo, 2007**).

### **I.1.4. Toxicité des huiles essentielles**

Les HE sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels. Néanmoins, il est important de souligner que l'automédication fréquente et abusive surtout en ce qui concerne le dosage ainsi que le mode d'application interne ou externe par les essences est nocive. Elle engendre des effets secondaires plus ou moins néfastes dans l'organisme (allergies, coma, épilepsie, etc...) principalement chez les populations

sensibles (enfants, femmes enceintes et allaitantes, personnes âgées ou allergiques). L'ingestion de plus de 10 ml d'huile essentielle par exemple est neurotoxique et épileptogène par inhibition de l'apport d'oxygène au niveau des tissus Encéphalique (**Da silva, 2010 ; Lakhdar, 2015 ; Ouis, 2015**).

### **I.1.5. Utilisation des huiles essentielles**

Le champ d'application des huiles essentielles est vaste, mais quatre principaux secteurs de leur utilisation à une échelle industrielle peuvent être retenus :

#### **I.1.5.1. En industrie agroalimentaire**

Elles sont employées quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, laurier, thym...etc.), les boissons gazeuses et alcooliques, les produits laitiers, les produits carnés, les produits de boulangerie, les confiseries, mais aussi pour la nutrition animale (**Bruneton, 1999**). Les huiles essentielles ou leurs composés actifs sont également utilisés comme agents conservateurs, grâce à leurs propriétés antimicrobienne et antioxydante, qui permettent d'augmenter la durée de conservation des produits alimentaires (**Caillet et Lacroix, 2007 ; Tiwari et al., 2009**). Un certain nombre d'herbes aromatiques, notamment de la famille des Lamiacées, ont montré leur efficacité pour la conservation de la viande ou de certains plats cuisinés comme le thym et l'origan, ou encore, dans le contrôle de contamination dans les yaourts comme la menthe (**Fernandes et Chemat, 2012**). La plupart des huiles essentielles sont classées comme GRAS (Generally Recognized As Safe) ou généralement reconnus comme sains ou sont approuvées comme additifs alimentaires par l'administration Américaine des aliments et des médicaments FDA (Food Drug Administration) (**Caillet et Lacroix, 2007**)

#### **I.1.5.2. Pharmacie et Aromathérapie**

Les huiles essentielles et leurs vertus thérapeutiques sont connues depuis très longtemps. Elles constituent la base de la médecine traditionnelle et représentent un outil très efficace qui permet d'élargir le champ des traitements médicaux conventionnels. Elles peuvent être utilisées directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de principes actifs (**Mnayer, 2014 ; Bessah et El-Hadi, 2015**).

Dans le domaine pharmaceutique, il n'existe pas de réglementation spécifique aux huiles essentielles en ce qui concerne leur utilisation dans les médicaments, les spécialités pharmaceutiques à base d'huiles essentielles répondent à la définition du médicament à base de

plantes, c'est à dire, des médicaments dont les principes actifs sont exclusivement des drogues végétales et/ou des préparations à base de drogue(s) végétale(s) (**Poirot, 2016**). L'industrie pharmaceutique les emploie sous un nombre grandissant de formes (complexes à vaporiser, pastilles, gélules, dentifrices...etc) (**Deschepper, 2017**). Grâce à leurs propriétés aromatisantes, elles permettent de masquer l'odeur désagréable de médicaments absorbées par voie orale, bien qu'en grande partie les huiles sont préparées sous forme galénique, elles sont également très utilisées dans la préparation d'infusion (**Ouis, 2015**).

En milieu clinique, les huiles essentielles sont employées pour soigner des maladies inflammatoires, des rhumatismes, des infections causées par des bactéries, des levures, des champignons et des virus, notamment, les infections nosocomiales, mais aussi, dans le traitement des troubles humoraux et nerveux, des pathologies dermatologiques, et dans la prévention de certains types de cancers (**Chouitah, 2012 ; Chibani, 2013 ; Abadlia et Chebbour, 2014 ; Bessah et El-Hadi, 2015**)

Par ailleurs, les huiles sont bonnes pour la digestion, détoxifiantes et efficaces contre les maux de tête et les spasmes (**Delune, 2012 ; Laurent, 2017**). Leur application par diffusion atmosphérique, permet de calmer, détendre ou faciliter le sommeil réduisant ainsi, le stress, l'anxiété et la nervosité (**Delune, 2012 ; Laurent, 2017**). Egalement, leur application sur la peau par massage, permet de soulager les crampes, les rhumatismes, les douleurs, la circulation sanguine...etc (**Scimeca et Tétou, 2005 ; Mnayer, 2014**).

### **I.1.6. Procédés d'extraction des huiles essentielles**

Il existe plusieurs méthodes qui permettent d'extraire les essences aromatiques des végétaux. Les plus utilisées sont la distillation par entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodistillation et l'expression alcoolique par solvant (**Boukhatem et al., 2019**). Le choix de la meilleure méthode est déterminé par la nature de la matière végétale à traiter, les propriétés physico-chimiques de l'essence à extraire, l'usage de l'extrait, la capacité à minimiser les coûts ainsi que la sensibilité de certains constituants de l'huile essentielle aux hautes températures (**Richard et Etievant, 1997; Hellal, 2011**).

#### **I.1.6.1. Entraînement à la vapeur d'eau**

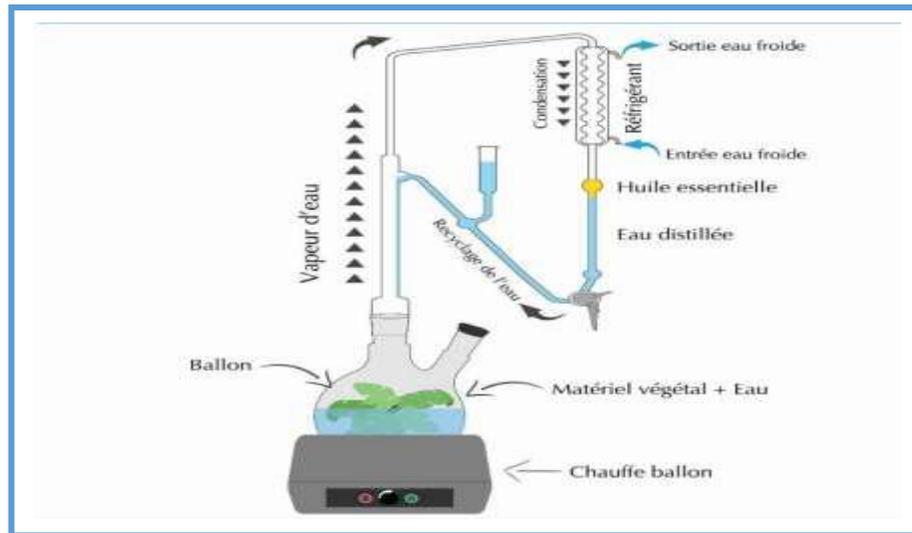
La distillation à la vapeur est une méthode ancienne très répandue, destinée à l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques. Cette technique ne met pas

en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De 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), cette méthode d'extraction minimise les altérations hydrolytiques (**Rojas et Buitrago, 2015**). La plante ne macère (immerge) pas directement dans l'eau, ce qui limite les phénomènes d'hydrolyse et valorise la qualité des extraits. Ainsi que le risque de dégradation par la chaleur est mieux maîtrisée puisque le chauffage ne se fait pas directement sur la cuve contenant la matière première végétale (**De Sousa, 2012**).

### **I.1.6.2. Hydrodistillation**

L'hydrodistillation est une méthode ancienne très utilisée (**Bruneton, 2016**). Elle consiste à immerger directement le matériel végétal dans un alambic (ballon) rempli d'eau distillé (**Figure 02**) puis l'ensemble est porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et libère les composés volatiles qui y sont contenus. Ces composés volatiles forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique (**Asbahani et al., 2015**). Le mélange est ensuite refroidi, condensé puis séparé par différence de densité en une phase aqueuse et phase organique qui constitue l'huile essentielle.

Cependant, la longue durée de procédé (température du milieu et parfois de l'acidité) peut produire des réactions d'hydrolyse, ce qui facilite la survenue d'un certain nombre de transformations au sein de composés des huiles essentielles (**Fernandez et Chemat, 2012 ; Boukhatem et al., 2019**).



**Figure 02** : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Malti, 2019)

### I.1.6.3. Extraction par micro-ondes

Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement, et décantation (Koubaa et al., 2016). Cette technique possède plusieurs avantages tels que la rapidité, l'utilisation de petites quantités de solvant, et donne un bon rendement d'extraction (Barba Orellana et al., 2016; Boukhatem et al., 2019).

### I.1.6.4. Extraction par les solvants et extraction au CO<sub>2</sub>

Cette technique, largement utilisée actuellement. Elle consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant (hexane, méthanol, éthanol, acétone ..... ) à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras (Koubaa et al., 2016; Boukhatem et al., 2019).

## **Chapitre II**

### *Monographie des plantes étudiées*

## I.2. Présentation des plantes étudiées

### I.2.1. *Origanum majorana* L.

#### I.2.1.1. Historique

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 03**). 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 Marjolam*, marjolaine à coquilles, Marjolaine française. En Afrique du Nord, elle est appelée : Khezama (Tunisie), Meurdekouch (Maroc), Mardguscia (Tripoli, Libye), et parfois Mazerrouch ou Marikoum, noms données aussi à d'autres espèces d'*Origanum* (**Soliman et al., 2009 ; Semiz et al., 2018**).

#### I.2.1.2. Origine et aire de répartition

*Origanum majorana* est communément connu comme originaire de Chypre, Antalya (Turquie), distribué dans différentes parties des pays du bassin méditerranéen comme la Serbie, l'Italien la Corse, le sud de l'Espagne, le Portugal, le Maroc et l'Algérie (**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 (**Bouyahia et al., 2021**)

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 ; Bouyahia et al., 2021**). 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).

### **I.2.1.3. Description botanique**

*Origanum majorana* L., est un sous-arbuste vivace, herbacé sauvage et annuel cultivé comme plante aromatiques qui peut atteindre 30 à 60 cm de hauteur, et se caractérise par des tiges rougeâtres multiramifiées quadrangulaires et qui débordent pour créer un monticule (Bouyahya et al., 2021). Ses tiges sont dressées, faibles, poilues, rondes, de couleurs vertes avec des taches rouges et qui font 80 cm de long.

Les feuilles de cette plante sont herbacées, globuleuses, simples, pétiolées et ovales à oblongues-ovales, petites (0,5–1,5 cm de long et 0,2–0,8 cm de large), souvent quadrangulo-cylindriques, et la texture est extrêmement lisse et poilue. Les bractées sont différentes des feuilles, densément imbriquées, aussi longues que des calices, de couleur vert gris, et disposées face à face sur une tige carrée.

La marjolaine douce a de petites fleurs (0,3 cm de long et disposées en têtes en forme de loupe, de 1,3 cm de long), hermaphrodites ou femelles. Les fleurs sont tubulaires à deux lèvres, 1 labelle pour une ou plusieurs lèvres supérieures entières ou denticulées. Il a des calices aplatis, des fleurs blanches ou rose pâle avec des bractées vert gris qui fleurissent en épi de juin à septembre. Bien que les graines mûrissent d'août à septembre. Ils sont ovales, de couleur foncée et brune. Les racines sont sub-cylindriques, ridées longitudinalement avec des fissures transversales ; 0,2 à 0,6 mm de diamètre. La surface externe est brun foncé tandis que l'intérieur est brun clair avec plusieurs longues radicelles (Figure 03) (Vasudeva et Goel., 2015 ; Ietswaart, 1980 ; Iserin, 2001 ; Prerna et Vasudeva, 2015 ; Chenna et al., 2018 ; Bouyahya et al., 2021).



**Figure 03** : Plante d'*Origanum majorana* L. (Originale, 2022)

#### I.2.1.4. Systématique

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

**Tableau 01** : Position systématique de l'*Origanum majorana* L.

Régne	:	Plantae
Sous-régne	:	Viridiplante
Super division	:	Embryophyta
Division	:	Trachéophytina
Sous-division	:	Spermatophytina
Classe	:	Magnoliopsida
Super-ordre	:	Asteridae
Ordre	:	Lamiales
Famille	:	Lamiaceae
Sous-famille	:	Néptoïdées
Genre	:	<i>Origanum</i> L
Espèce	:	<i>Origanum majorana</i> L

**I.2.1.5. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* L.**

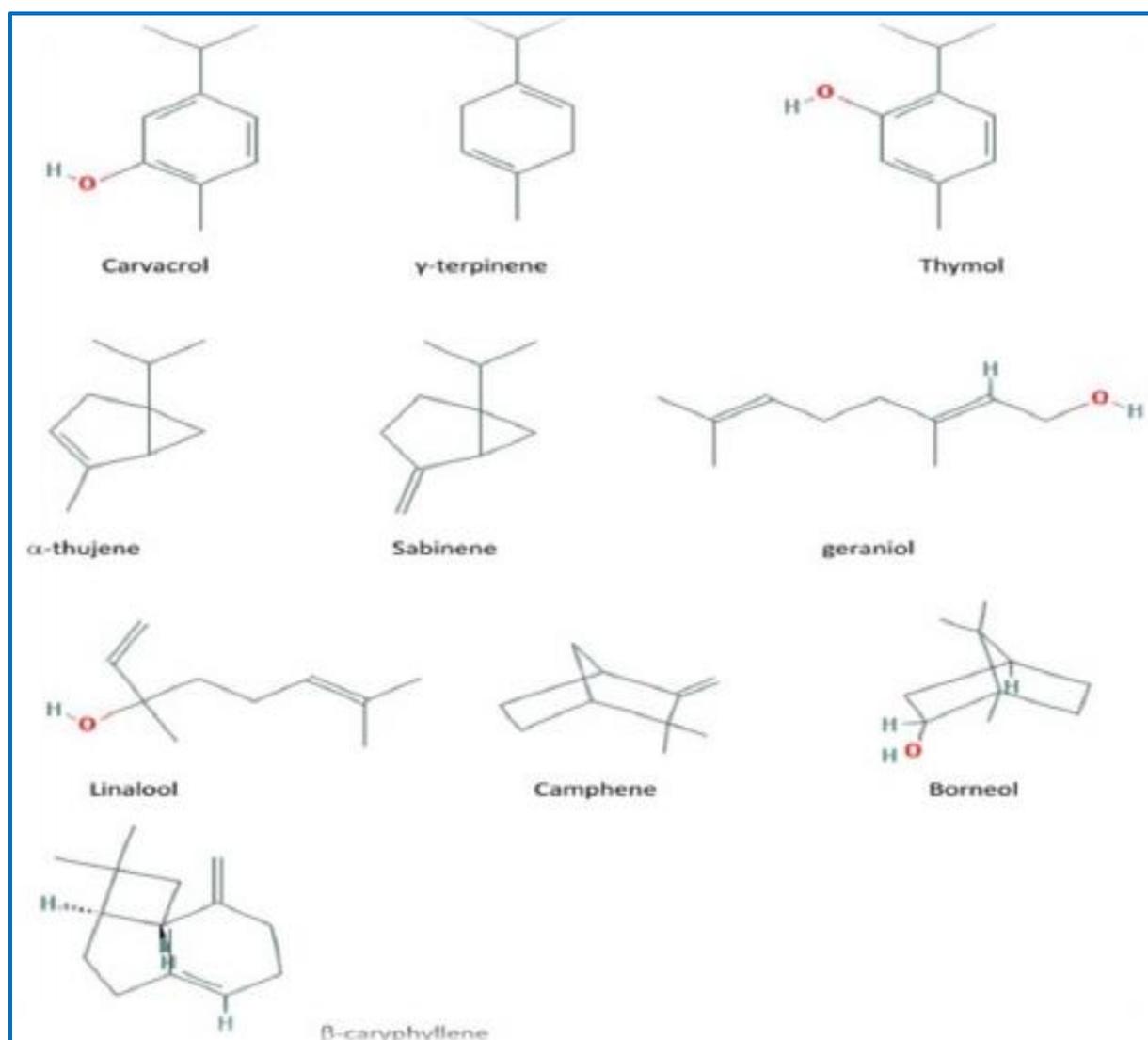
L'*O. majorana* se caractérise par de fortes saveurs et odeurs agréables et épicées. En particulier, cette herbe contient jusqu'à 3% d'huile volatile et comme principaux constituants, en raison de sa nature aromatique (comprenant de l'hydrate de sabinène, du carvacrol, du linalol et autres triperpènes), les acides caféique et rosmarinique, les flavonoïdes, et les composés triterpéniques tels que l'acide oléanolique et acide ursolique, des stéroïdes (par exemple, le  $\beta$ -sitostérol), des terpénoïdes phénoliques, des glycosides phénoliques, des tanins, et des sitostérols. Elle contient aussi du sabinol,  $\alpha$ -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 ( $\alpha$ -terpinolène et  $\gamma$ -terpinolène), le thymol et le carvacrol. Autres métabolites secondaires : le rosmarinat de méthyle, l'apigénine et la lutéoline-7-O-rutinoside (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.04). (Kahouli, 2010) :

- **Les monoterpènes** :  $\gamma$ -terpinène (12.60%),  $\alpha$ -terpinène (7.73%), sabinène (7.65%), terpinolène (2.92%),  $\beta$ -phellandrène (1.90%), limonène (1.76%), p-cymène (1.57%),  $\alpha$ -pinène (0.77%),  $\alpha$ -thujène (0.77%), alphaphellandrène (0.56%),  $\beta$ -pinène (0.43%).
- **Les monoterpénols** : terpinén-4-ol (22.85%), (E)-hydrate de sabinène (15.94%),  $\alpha$ -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** :  $\beta$ -caryophyllène (2.49%), bicyclogermacrène (1.22%).
- **les esters terpéniques** : acétate de linalyle (1.70%).



**Figure 04.** Structure de certains des principaux composés actifs d'*Origanum majorana* (Bina et al., 2017)

#### I.2.1.6. Utilisation et propriétés thérapeutiques de la marjolaine

La marjolaine est utilisée beaucoup dans la médecine traditionnelle aussi bien que dans l'industrie cosmétiques (Deshmane et al., 2007). C'est une épice populaire très utilisée en cuisine et ce depuis des siècles, elle est également utilisée comme remède à de nombreuses maladies (Gramza-Michalowska et al., 2008).

L'application thérapeutique dépend des parties de la plante. Elle contribue à de multiples activités bénéfiques pour la santé. Traditionnellement, les feuilles de marjolaine représentent la partie la plus utilisée, notamment comme anti-refroidissement (Bellakhdar et al., 1991 ; Benlamdini et al., 2014) , antipyrétique (Bellakhdar et al., 1991), contre les allergies, la grippe, l'hypertension (Benali et al., 2017) et également pour la régulation de la glycémie et

le catarrhe (Vasudeva et Goel., 2015). En effet, l'*Origanum* est un remède à la maison, il est utilisé en décoction ou en infusion pour le traitement des infections pulmonaires, les maux de gorge, les troubles nerveux, l'insomnie, la nervosité et pour les soins de la peau (Bouyahia et al., 2021).

La marjolaine vraie possède des vertus toniques générales, diaphorétiques, diurétiques et expectorantes (Deshmane et al., 2007) et est utilisé comme médicament antiasthmatique et antiparalytique, spasmodique 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 utilisé 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).

Par ailleurs, l'*Origanum majorana* est utilisée contre les crampes, les troubles digestifs, les maux de tête, la dépression, il est utilisé 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 antiprolifératifs, anti-inflammatoires, et antioxydants sont attribués à sa quantité élevée en acides phénoliques, et en flavonoïdes utilisés 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, l'arthrite et la congestion thoracique. La plante peut également 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).

En outre, 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 02**.

**Tableau 02.** Utilisations ethnomédicinales d'*O. majorana* (**Bina et al., 2017**)

Région	Partie végétale utilisée	Utilisations traditionnelles
Iran ( <b>Bina et al., 2017</b> )	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.

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

## I.2.2. *Mentha spicata* L.

### I.2.2.1. Origine et aire de répartition

Les origines de *Mentha spicata* sont incertaines. Selon certains botanistes, elle serait le résultat d'une hybridation très ancienne entre *Mentha rotundifolia* et *Mentha longifolia* (Douay, 2008).

La menthe verte, menthe crépue ou menthe douce, du nom latin « *Mentha* », est l'une des plus anciennes plantes médicinales connues : les archéologues ont découvert ses feuilles dans des pyramides d'Égypte vieilles de 3 000 ans (Benayad, 2008). Ces essences, autant qu'elles sont faciles à reconnaître à leur odeur tout à fait caractéristique, autant elles sont difficiles à distinguer les unes des autres, en raison des formes intermédiaires, d'origine hybride, qui les relie. Parmi toutes les lamiacées, les menthes se reconnaissent, en plus de leur odeur spéciale, à leurs fleurs très petites, à leurs corolles presque régulières à quatre lobes presque égaux et leurs quatre étamines également presque égales (Benayad, 2008).

### I.2.2.2. Description botanique

*Mentha spicata* L. est une herbe aromatique qui appartient à la famille des lamiacées (Abootalebian et al., 2016), ces dernières sont très homogènes et faciles à identifier (Brahmi, 2016).

C'est une plante vivace et rampante (Bremness, 2011). Elle se caractérise par une tige carrée droite et verte, qui ne dépasse pas plus d'un mètre de longueur. Ses feuilles sont d'un vert foncé, opposées, sessiles, subsessiles et allongées à ovales ou lancéolées de 5 à 9 cm de longueur et de 1.5 à 3 cm de largeur (Sennoussi, 2015). Les fleurs comportent quant à elles un calice en forme de clochette ; glabre ou cilié, divisé en 5 dents, une corolle violette pale, rose ou blanche, 4 étamines saillantes de taille identiques, un ovaire super et divisé en deux loges renfermant chacune deux ovules (Figure 05) (Brahmi, 2016).



**Figure 05 :** Les parties aériennes de *Mentha spicata* L. (originale 2022).

### I.2.2.3. Systématique

Le genre *Mentha* L. comprend 42 espèces, des centaines de sous-espèces, 15 hybrides, cultivars et variétés (Brahmi et al., 2017 ; Salehi et al., 2018 ; Silva, 2020). Le tableau suivant représente la classification de *Mentha spicata* L.

**Tableau 03 :** Taxonomie de *Mentha spicata* L (Moon et al., 2009 ; Lansdown, 2014).

<b>Règne</b>	:	Plantes
<b>Sous règne</b>	:	Trachéophytes
<b>Embranchement</b>	:	Spermaphytes
<b>Sous-embranchement</b>	:	Angiospermes
<b>Classe</b>	:	Dicotylédones
<b>Ordre</b>	:	Lamiales
<b>Famille</b>	:	Lamiaceae
<b>Genre</b>	:	<i>Mentha</i>
<b>Espèce</b>	:	<i>Mentha spicata</i> L

Son nom vernaculaire en arabe « Naànaa », en anglais « spearmint » (Zekri, 2016), et en français « menthe verte ». *Mentha spicata* L., pousse spontanément dans les zones tempérées et elle est cultivée partout dans le monde (Laggoune et al., 2016).

#### I.2.2.4. Composition phytochimique d'huile essentielle de la menthe

L'utilisation réussie des plantes par ses industries agro-alimentaires, alimentaires et pharmaceutiques repose sur une compréhension complète de leurs métabolites secondaires biologiquement actifs (Koblovská et al., 2008). De nombreux genre de *Mentha* ont fait l'objet d'une enquête pour leur propriétés phytochimiques et pharmacologiques ces dernières années (Brahmi et al., 2017 ; Salehi et al., 2018 ; Anwar et al., 2019 ; Mahendran et Laiq ur Rahman, 2020). Les feuilles de *M. spicata* sont riches en huile volatile, phénols, flavonoïdes et en lignanes.

##### · Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont l'un des composés actifs les plus importants de toute la plante. Des recherches antérieures sur *M. spicata* ont suggéré la présence d'acide rosmarinique et d'acide caféique comme principaux métabolites (Bahadori et al., 2018). L'acide chlorogénique a été isolé de *M. spicata* (Kivilompolo et Hyotylainen 2007 ; Fatiha et al., 2015 ; Igoumenidis et al., 2016).

##### · Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont l'un des principaux polyphénols alimentaires et sont classés en six groupes, y compris les flavonols, les flavanones, les anthocyanes, les flavonols, les isoflavones et les flavones (Pandey et Rizvi, 2009). 22 flavonoïdes ont été isolés de *M. spicata*. Erenler et al. (2018) ont isolé quatre flavonoïdes des parties aériennes de *M. spicata* en utilisant une solution aqueuse et en les identifiant par RMN, LC-TOF/MS et HPLC. L'apigénine a été identifiée par HPLC à partir de *M. spicata* (Dorman et al., 2003 ; Bimakr et al., 2011). L'HPLC réalisée sur l'extrait éthanolique des feuilles a permis l'isolement et l'élucidation de la Diosmine et de la Lutéoline (Fatiha et al., 2015). Cirsilinéol, Desméthylnobilétine, Thymusine, des composés ont également été retrouvés dans un extrait éthanolique de feuilles de cette plante (Voirin et al., 1999). La sidéritoflavone et la thymonine ont également été identifiées et quantifiées à partir des feuilles de *M. spicata* (Yamamura et al., 1998 ; Voirin et al., 1999). Un résumé des principaux constituants phytochimique de *Mentha spicata* est donné dans le **tableau 04**

**Tableau 04** : Composition biochimique de *Mentha spicata* L (Brahmi et al., 2016)

<b>Les huiles essentielles</b>
Carvone, Limonene, 1.8-cineole, $\beta$ -Caryophyllene, D-germacerne.
<b>Composés phénoliques</b>
<b>Acides phénoliques</b> : Acide 4-hydroxybenzoïque, Acide cafeïque, acide $\alpha$ -coumarique, acide chlorogénique et acide rosmarinique
<b>Flavonoïdes</b> : rutine, naringénine, luteoline, diosmine, kaempferole et diosmétine.
<b>Autres composés</b>
Esters méthilique d'acide gras, triglycéride, squalène, stigmastérol, Sitostérol, acide oléanolique, ursolique et pomolique, caroténoïdes, alcaloïdes , saponines.

#### I.1.2.5. Utilisation et propriétés thérapeutiques de la menthe

*Mentha spicata* L. est la plus ancienne herbe médicinale (Nanekarani et al., 2012). Grâce à ses propriétés thérapeutiques (antifongique, antivirale, antimicrobienne, insecticide et antioxydant) (Almeida et al., 2012), les feuilles de cette plante ont été utilisées traditionnellement pour le traitement de plusieurs maladies (rhume, spasmes, crampes, troubles digestives, fièvre, maux de tête, bronchite, nausée, rhumatisme, troubles gastrointestinaux et douleurs des dents). L'huile de cette menthe est utilisée comme un arôme dans des dentifrices, chewing-gum, savons et aussi dans des soupes, parfumeries, détergents et pesticides (Soysal, 2005 ; Brahmi et al., 2012).

## **Chapitre III**

### ***Activités biologiques des huiles essentielles***

### I.3. Activité antioxydante

#### I.3.1 Le stress oxydant

Élément indispensable à notre survie, à notre vie, à notre développement, à notre capacité d'adaptation ; l'oxygène est également à l'origine de toxicité, d'acidité, d'altération, de dégénérescence. En effet, le métabolisme de l'oxygène, lorsqu'il est dérégulé, peut entraîner de part ce que l'on appelle « le stress oxydant » (Koechlin-Ramonatox, 2006).

Il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN). Radicalaires ou non radicalaires, elles sont produites en permanence par plusieurs types cellulaires dans les organismes aérobies (Swain *et al.*, 2002; Baudin, 2006).

Le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des ERO, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants (Koechlin-Ramonatox, 2006).

#### I.3.2. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, un atome ou une molécule contenant un ou plusieurs électrons non appariés (Dasgupta et Klein, 2014 ; Li *et al.*, 2016), ils peuvent être chargés ou non chargés (Kerher et Klotz, 2015). Les radicaux libres peuvent être générés à partir de nombreux éléments, mais dans les systèmes biologiques, ce sont ceux impliquant l'oxygène et l'azote qui sont les plus importants (Burton et Jauniaux, 2011) ; soit par scission homolytique d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit par scission hétérolytique où un atome reçoit deux électrons lorsque les liaisons covalentes sont brisées. Et également, au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radical (Dasgupta et Klein, 2014 ; Halliwell et Gutteridge, 2015).

Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Les radicaux libres oxygénés ou, plus généralement, les espèces réactives de l'oxygène (ERO), ainsi que les espèces réactives de l'azote (ERN), sont des produits du métabolisme cellulaire normal (Valko *et al.*, 2007).

#### I.3.3. Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites à partir d'oxygène moléculaire comme résultat du métabolisme cellulaire normal (Ozougwu, 2016). Cette appellation inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote ... etc) mais aussi certains dérivés réactifs non radicalaires (Tableau 05)

**Tableau 05** : Les principales espèces réactives de l'oxygène générées dans les systèmes biologiques (Nimse et Pal, 2015 ; Dutta, 2016 ; Ozougwu, 2016)

Nom	Symbole
<b>Espèces radicalaires</b>	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroxyle	$\cdot OH$
Radical peroxyde	$ROO^{\cdot}$
Radical alcoxyde	$RO^{\cdot}$
Monoxyde d'azote	NO
Radical tétrachlorure de carbone	$CCl_3$
<b>Espèces non radicalaires</b>	
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Acide hypochlorique	HOCl
Oxygène singulier	$^1O_2$
Peroxynitrite	ONOO
Ozone	$O_3$

#### I.3.4. Production des radicaux libres

L'accumulation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) peut être déclenchée par des facteurs exogènes et / ou endogènes (Silva et Coutinho, 2010), comme résumé dans la figure 06.

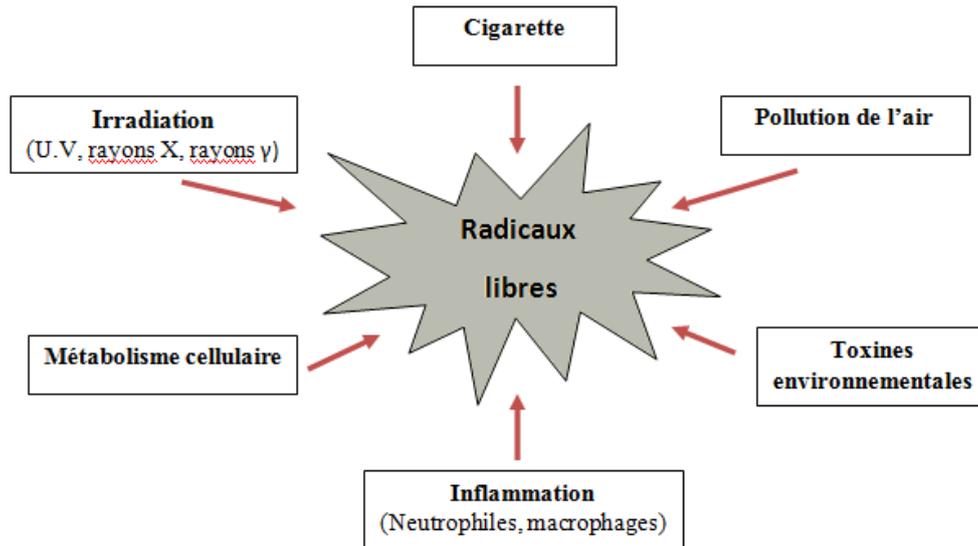
##### I.3.4.1. Production intracellulaire (endogène)

La production des ERO dans les cellules mammifères découle de plusieurs sources possibles mais essentiellement d'origine enzymatique (Douaouri, 2018).

##### I.3.4.2 Production extracellulaire (exogène)

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme.

Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérogènes non genotoxiques peuvent directement, ou indirectement, être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes...). Les rayonnements UV induisent la synthèse de l'intermédiaire d'agents photosensibilisants (Douaouri, 2018).



**Figure 06:** Résumé des sources exogènes et endogènes de radicaux libres (Douaouri, 2018).

### I.3.5. Les antioxydants

#### I.3.5.1. Définition

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat biologique (Bouhaddouda, 2016)

Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion. (Boudjouref Mourad, 2011)

#### I.3.5.2. Types d'antioxydants

Les antioxydants sont classés selon les caractères suivant :

##### ➤ Anti oxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydant in vivo. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E, etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres. (Abbes, 2014).

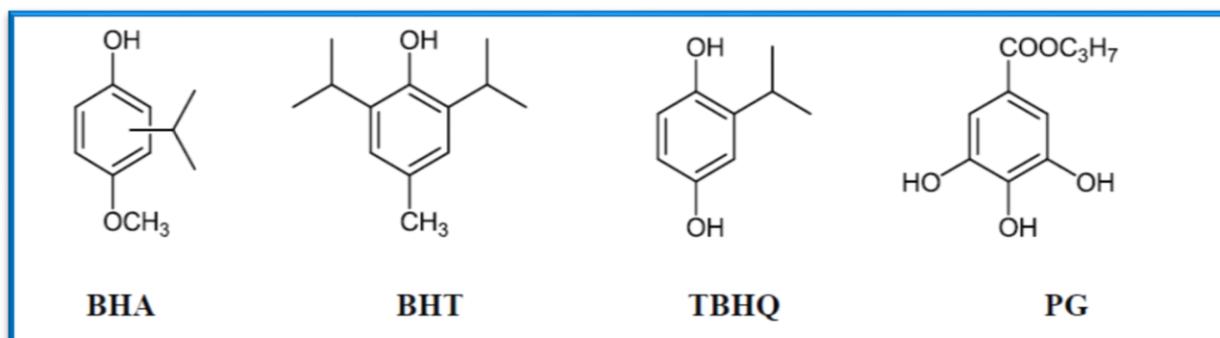
**Tableau 06** : Principaux antioxydants naturels et sources alimentaires associées.

(Manallah, 2012)

Principaux nutriments antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron.
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs beurre, œufs, noix.
b-carotène	Légumes, et fruits orangés, et vert foncés.
Sélénium	Poisson, œufs viandes céréales, volailles
Zinc	Viande, pain complet, légumes vert, huitres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert.
Acide phénolique	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin.
Métabolisme de cystéine, glutathion	Caséine, lactalbumine (petit – lait), produits laitiers brocoli, chou œuf, poissons viandes

➤ **Antioxydants synthétiques**

Les antioxydants de synthèse les plus connus sont les composés phénoliques tels que : Hydroxyanisolebutylé (BHA), Hydroxytoluènebutylé (BHT), tert-butylhydroquinone (TBHQ) et Gallate de propylée (GP). Les antioxydants synthétiques sont toujours substitués par un alkyle pour améliorer leurs solubilité dans les graisses et les huiles (Ferhat, 2016).

**Figure 07** : les structures moléculaires d'antioxydants synthétiques.

➤ **Substances synergiques**

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants. Ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection, parmi eux se trouvent : Les acides

lactique, tartrique et ortho phosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants.

### **I.3.5.3. Mécanisme d'action des antioxydants**

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés de phénols.

En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de position appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire (**Lanseur, 2017**)

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras .tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (**Cillard, 2006**).

### **I.3.5.4. Utilisation des antioxydants**

- **Dans l'industrie chimique** : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation.
- **Dans l'industrie agro-alimentaire** : pour éviter le rancissement des corps gras.
- **Dans l'industrie teinturerie** : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture. (**Bouras et Houchi, 2013**)

### **I.3.5.5. Activité antioxydante des huiles essentielles**

Les plantes et différentes parties de plantes telles que les fleurs, les tiges et les racines peuvent être la source d'antioxydants naturels, notamment les polyphénols, les caroténoïdes et les vitamines. Les HE de ces plantes présentent une activité antioxydante en plus de plusieurs activités biologiques telles que antimicrobienne, anticancéreuse, anti-inflammatoire et anti-âge

(Snoussi *et al.*, 2016 ; Xu *et al.*, 2017 ; Mutlu-Ingok *et al.*, 2020). Récemment, de nombreuses recherches ont été menées sur l'activité antioxydante de différentes huiles essentielles. Les teneurs en phénol total (TPC), en flavonoïde total (TFC), en flavonol total, en acide phénolique, en catéchine, en lignane et en tanin des HE ont été les principaux paramètres mesurés lors de l'évaluation des propriétés antioxydantes. (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020).

Par ailleurs, les composés d'huiles essentielles étant rapportés comme étant les plus actifs sont les phénols tels que le thymol et le carvacrol. Leur activité est liée à leur structure phénolique qui leur confère des propriétés oxydo-réductrices, et leur permette de jouer donc un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres et dans la décomposition des peroxydes (Braga *et al.*, 2006). Certains alcools, éthers, cétones, aldéhydes monoterpéniques (linalool, 1,8-cinéole, géraniol/nérol, citronellal, isomenthone, menthone) et monoterpènes ( $\gamma$ -terpinène, et  $\alpha$ -terpinolène) y contribuent également dans l'activité antioxydante des huiles (Edris, 2007).

#### I.4. Activités antibactériennes

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1995). Depuis cette période, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques (Touré, 2015).

Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba, 2003 ; Avlessi, 2012). Ces huiles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (Oussou *et al.*, 2008). Leur activité antibactérienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Sipailiene *et al.*, 2006).

##### I.4.1. Les huiles essentielles comme agents antibactériens

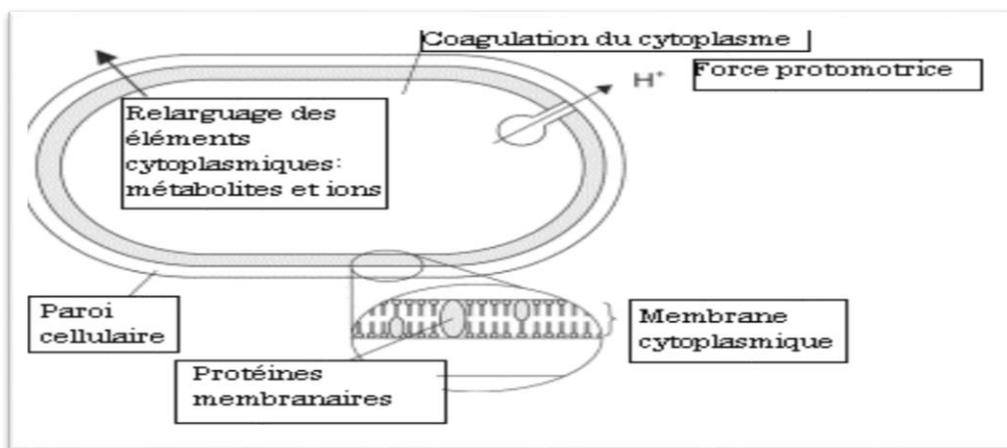
Les huiles essentielles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et Kunicka, 2003). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, ces dernières paraissent moins sensibles à leur action que les bactéries Gram positives. Ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Il existe cependant quelques exceptions. En effet, *Aeromonas hydrophila* (Wan *et al.*, 1998) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn *et al.*, 2005) ont été décrites comme parti-

culièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La bactérie Gram négative reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins *Pseudomonas aeruginosa* (Dorman et Deans, 2000).

La nature antibactérienne des huiles essentielles est principalement due à leur fort contenu en composés phénoliques, à savoir, le thymol, l'eugénol et le carvacrol. Ce dernier est le plus actif de tous (Pauli, 2001 ; Zhiri, 2006 ; Kaloustian et al., 2008), suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, linalool, thujanol, myrcénol, pipéritol et terpinéol), des aldéhydes (néral et géraniol) et des monoterpènes ( $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, p-cymène et  $\gamma$ -terpinène...etc) (Daferera et al., 2000 ; Baranauskiene et al., 2003 ; Burt, 2004 ; Zhiri, 2006).

#### I.4.2. Mode d'action

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (Burt, 2004). Compte-tenu de la variabilité quantitative et qualitative des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Bajpai et Kang, 2010). La principale caractéristique des huiles essentielles est attribuée à l'hydrophobicité de certains de leurs composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en provoquant une déstabilisation de sa structure et en augmentant sa perméabilité (Souza et al., 2006). Ces modifications entraînent des pertes anormales d'ions et de composés intracellulaires et la coagulation du contenu protéique des cellules (Davidson et Parish, 1989 ; Ultee et al., 2002). Les principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles sont indiquées ci-dessous (figure 08).



**Figure 08** : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004)

## **Partie II**

---

### **Matériels et méthodes, résultats et discussion**

L'ensemble de ce travail a été effectué au sein des laboratoires suivants :

- Laboratoire de Recherche « Eau, Roche et Plantes »
- Laboratoire de Valorisation des Substances Naturelles (LVSN)
- Laboratoire pédagogique de Biochimie de l'Université Djilali Bounaama de Khémis Miliana.
- Laboratoire privé d'analyses médicales de Dr Zibouche A. à Ain Defla,

### **II.1. Matériels**

#### **II.1.1. Matériel végétal**

Les plantes utilisées dans le cadre de notre étude sont l'*Origanum majorana* L. et *Mentha spicata* L.

Le matériel végétal est constitué des feuilles des deux plantes sélectionnées. La récolte de la partie aérienne d'*Origanum majorana* L et de *Mentha spicata* a été faite au stade début de floraison d'une manière aléatoire au mois de Mars 2022, dans deux régions de la Wilaya de Ain Defla à savoir, la région de Mekhateria pour la marjolaine et la région de Djendel pour la menthe.

#### ➤ **Localisation géographique**

La région de Djendel est située à 40 km à l'est d'Ain Defla, à une altitude de 310 m, une latitude de 36° 13' 07" nord et une longitude de 2° 24' 32" est, ce caractérisés par un climat méditerranéen avec été chaud. Alors que celle de Mekhatria est localisée à 10 km au Nord de la wilaya de Ain Defla, à une latitude de 36° 18' 09" nord, une longitude de 1° 57' 35" est et une altitude de 275 m ce caractérisés par un climat semi-aride sec et chaud (**Figure 09**).



Figure 09 : Localisation des régions de la récolte des lamiacées étudiées (Original, 2022)

### II.1.2. Souches microbiennes

Pour cette étude, trois souches bactériennes ont été choisies et proviennent du laboratoire privé d'analyses médicales de Mr Zibouche (Ain Defla). Deux d'entre-elles sont Gram négatives ; *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Et une autre Gram positive *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

### II.1.3. Matériel non biologique

L'ensemble du matériel non biologique est illustré dans l'Annexe I.

## II.2. Méthodes

### II.2.1 Traitements préliminaires des feuilles utilisées

Les échantillons une fois prélevés ont été par la suite, mis dans des sachets en plastique et portés directement au laboratoire pour être desséchés.

#### II.2.1.1. Séchage et conservation

Les échantillons et/ou les feuilles de la marjolaine collecté ont été regroupés et mis dans un endroit sec, ombragé, aéré et à température ambiante, sur une paille de laboratoire pendant 21 jours (Figure 10). Devenus secs (Figure 11), ils ont été récupérés dans des sacs en papier

pour servir ultérieurement à l'extraction des huiles essentielles (Yakhlef, 2010 ; Medjekane, 2017).



**Figure 10** : Le séchage des feuilles d'*Origanum majorana* (Original, 2022)



**Figure 11** : Les feuilles d'*Origanum* après le séchage (Original, 2022)

Pour la menthe, les feuilles, fraîchement récoltées, ont été séchées à l'ombre, dans un endroit sec et aéré pendant environ 15 jours (Figure 12). Devenues sèches elles ont été récupérées dans des sacs en papier jusqu'à utilisation. (Figure 13).



**Figure 12** : Séchage des plantes de la menthe (Originale, 2022)



**Figure 13** : Echantillons de la menthe secs (Originale, 2022)

### II.2.2. Screening phytochimique

Le but est de mettre en évidence la présence ou l'absence des principaux métabolites secondaire dans les feuilles d'*Origanum majorana* L. et *Mentha spicata* L. Les tests sont réalisés soit sur la poudre, soit sur un infusé préparé. Les tests ont été effectués au laboratoire pédagogique de

Biochimie où nous avons caractérisé les différents groupes chimiques en nous référant aux techniques décrites par **Bruneton (1999)**.

### **II.2.2.1. Préparation des extraits aqueux**

Les extraits aqueux sont des préparations aqueuses à partir des plantes médicinales entières ou des parties de celles-ci, convenablement divisées pour être plus facilement pénétrées par l'eau (**Cheurfa, 2015**). Pour cela, nous avons infusé pendant 15min 20g de la poudre sèche de chacun échantillon dans 200 ml d'eau distillée bouillante. Les infusés ont été filtré pour produire les extraits aqueux (**Figure 14, 15 et 16**).



**Figure 14** : Broyage des feuilles.



**Figure 15** : Préparation de l'infusé



**Figure 16** : Filtration de l'infusé

### II.2.2.2. Caractérisation des principaux constituants chimiques

#### ✚ Les tanins :

5 ml d'infusé auxquels on rajoute quelques gouttes d'une solution de Fe Cl<sub>3</sub> à 5%.

La réaction donne une coloration bleu-noir en présence des tanins (**Bruneton, 1999**).

- Les tanins galliques :

A l'aide d'une pipette graduée 5 ml d'infusé sont introduit dans une fiole auxquels 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de Fe Cl<sub>3</sub> sont ajoutés.

Après agitation, une coloration bleue foncée apparaît en présence des tanins galliques (**Bruneton, 1999**).

#### ✚ Les alcaloïdes :

Le test a été réalisé par des réactions de précipitation avec le réactif de Wagner, 1ml de l'extrait sont mis dans un tube à essai puis, on y ajoute quelques gouttes de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité rouge-orangé ou brun rougeâtre indique un test positif (**Vijay et al, 2013**).

#### ✚ Les flavonoïdes :

Quelques gouttes d'une solution de 10% d'acétate de plomb sont ajoutées à 1 ml de la solution d'essai. Il donne lieu à la formation d'un précipité jaune confirmant la présence des flavonoïdes (**Bhandary et al., 2012**).

#### ✚ Les saponosides :

Dans un tube à essai, on introduit 2 ml d'infusé auxquels, on rajoute quelques gouttes d'acétate de plomb. La formulation d'un précipité blanc indique la présence des saponosides.

#### ✚ L'Amidon :

A 2g de poudre végétale on rajoute quelques gouttes d'Iode (I<sub>2</sub>). Une coloration bleue violette est obtenue en présence de l'amidon (**Bruneton, 1999**).

#### ✚ Les glycosides :

A 2g de poudre végétale on rajoute 10ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glycosides (**Bruneton, 1999**).

### II.2.3. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

L'hydrodistillation (water distillation) est la méthode la plus simple et de ce fait, la plus anciennement utilisée (**Mebarki, 2010 ; Abdelli, 2017**).

Le principe consiste à porter à ébullition dans un ballon, un mélange d'eau et de plante dont on souhaite extraire l'huile essentielle. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules

odorantes, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient (Bruneton., 1999).

### ➤ Mode opératoire :

Cette méthode consiste à introduire 50g de matière végétale (Figure 14), dans un ballon de 1 L contenant 600 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 1h30 à l'aide d'une chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, traversent le réfrigérant et se condensent ainsi avant de chuter dans une ampoule de décantation, l'huile se sépare par la suite de l'eau par différence de densité (Mebarki, 2010 ; Abdelli, 2017).



**Figure 17** : Une masse de 50 g des feuilles sèches de la marjolaine et de la menthe (Original, 2022)



**Figure 18 :** Hydrodistillateur de type Clevenger (Original, 2022)

### II.2.3.1 Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles obtenues après extraction des feuilles d'*Origanum majorana* L. et de *Mentha spicata* L. ont été conservées dans des eppendorfs bien fermés et couverts d'un papier aluminium à l'abri de la lumière puis conservé dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à son usage pour les tests chimiques et biologiques.

### II.2.3.2. Rendement des extractions

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle (RHE), est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction (MHE) et la matière végétale utilisée (MS) (**Benbouali, 2006**). Il est donné par la formule suivante :

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

**RHE :** Rendement de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* L et de *Mentha spicata* L en %.

**MHE :** Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme.

**MS :** Masse en gramme de la matière végétale sèche.

➤ **Rendement moyenne**

$$\text{RHE} = (\text{RHE}_1 + \text{RHE}_2 + \text{RHE}_3 + \dots + \text{R}_i) / n$$

n : le nombre des extractions.

## **II.2.4. Caractérisation des huiles essentielles**

### **II.2.4.1. Caractérisation organoleptique**

Chaque huile essentielle est caractérisées par ces caractères organoleptique tels que : l'odeur, l'aspect physique et la couleur (**Bentchicou, 1999 ; Hameurlaine, 2009**).

- **L'aspect physique** : l'aspect d'une huile dépend des produits qui la constituent, elle peut apparaître sous forme liquide, solide ou bien semi solide.
- **L'odeur** : elle appartient aux sens chimiques les plus sensibles.
- **La couleur** : la coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent, donc la couleur change d'une huile essentielle à une autre ; elle peut être déterminée à l'œil nu.

### **II.2.4.2. Détermination des propriétés physico-chimiques**

Aujourd'hui, les propriétés physico-chimiques des HE (densité, indice de réfraction, indice d'acide, indice d'ester) sont exigées pour leur évaluation commerciale (**El Abed et Kambouche, 2003**).

#### **II.2.4.2.1. Les propriétés physiques**

##### **❖ L'indice de réfraction (NF T 75 112,1977)**

L'indice de réfraction est le rapport de la vitesse d'un rayon lumineux (la raie D du sodium 589 nm) dans le vide et sa vitesse dans le milieu. Autrement dit, c'est la mesure de la réfringence d'un corps donné par rapport à la raie D de sodium.

##### **➤ Mode opératoire**

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

Attendre que la température soit stable à 20°C et effectuer la mesure.

L'indice de réfraction (IR), à la température de référence t est donnée par l'équation suivante :

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

- **I<sub>20</sub>** : indice à 20°C.
- **I<sub>t</sub>** : indice à la température de chambre.
- **t** : température de mesure.

❖ **Le pH**

Le pH est exprimé par une valeur numérique. Il indique si une solution est acide ou basique, et représente aussi la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse (**Mèlet et Benchabane, 1997**). Le pH est déterminé à l'aide d'un papier pH.

**II.2.4.2.2. Les propriétés chimique des huiles essentielles**

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 (NF T 75 103,1982)**

L'indice d'acide est le nombre qui exprime en milligramme la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans un 1g de substance.

· **Mode opératoire**

Peser 0.5g d'HE. Introduire la prise d'essai dans un ballon. Ajouter 5ml d'éthanol à 95% et 2 à 3 gouttes de phénolphaléine. Titrer le liquide avec la solution d'hydroxyde de potassium (0,1N) jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistante pendant 30 secondes. Noter le volume de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé. L'indice d'acide (I.A) est donné par l'équation suivante :

$$I_A = 5.61 (v/m)$$

**v** : volume (ml) de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé pour le titrage.

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

**II.2.5. 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 (**Paolini, 2005**).

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**).

### **II.2.5.1 Analyse de composition chimique des huiles essentielles par 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 du 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-alcanes 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. 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-alcanes 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.

### **II.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum majorana* et *Mentha spicata***

La méthode de diffusion sur gélose a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne. Une suspension bactérienne de 18 à 24 heures de chaque souche bactérienne est préparée avec l'eau physiologique (Na Cl). Des boîtes de Pétri contenant la gélose de Mueller Hinton sont inoculées. A la surface de chaque boîte on dépose un disque de papier filtre (papier de Whatman) stériles de 6 mm de diamètre imbibés par 10 µl de différentes concentrations d'huile essentielle supplémentée de DMSO (HE pure, 1/2, 1/4). L'ensemble est incubé pendant 24 heures à 37°C. Cette méthode est dite **l'aromatogramme**.

Après 24 heures d'incubation, une zone ou un halo clair est présent autour du disque si l'huile essentielle inhibe le développement microbien. Dans la technique de diffusion il y a une compétition entre la croissance de la bactérie et la diffusion du produit à tester (**Belkhiri, 2015**).

### **II.3.1. Isolement des souches bactériennes**

On a fait un prélèvement des souches bactériennes qui sont testés par anse et ensemencés selon la méthode de stries sur une boîte de Pétri coulée par gélose nutritive puis incubé à 37C° pendant 24 heures, pour l'obtention des souches pures et jeunes.

### **II.3.2. Préparation des milieux de culture**

La gélose Mueller –Hinton est préparée en dissolvant 38g de poudre de gélose dans 1L d'eau distillé dans un ballon placé sur un agitateur plaque chauffante. La gélose dissolue est versée dans des flacons puis stérilisées dans l'autoclave à 120C° pendant 20mn, et en fin conservée dans le réfrigérateur à 4C° avant utilisation milieu Mueller –Hinton .est fondu dans un bain marie à 95C°.

**Le mode opératoire est comme suit :**

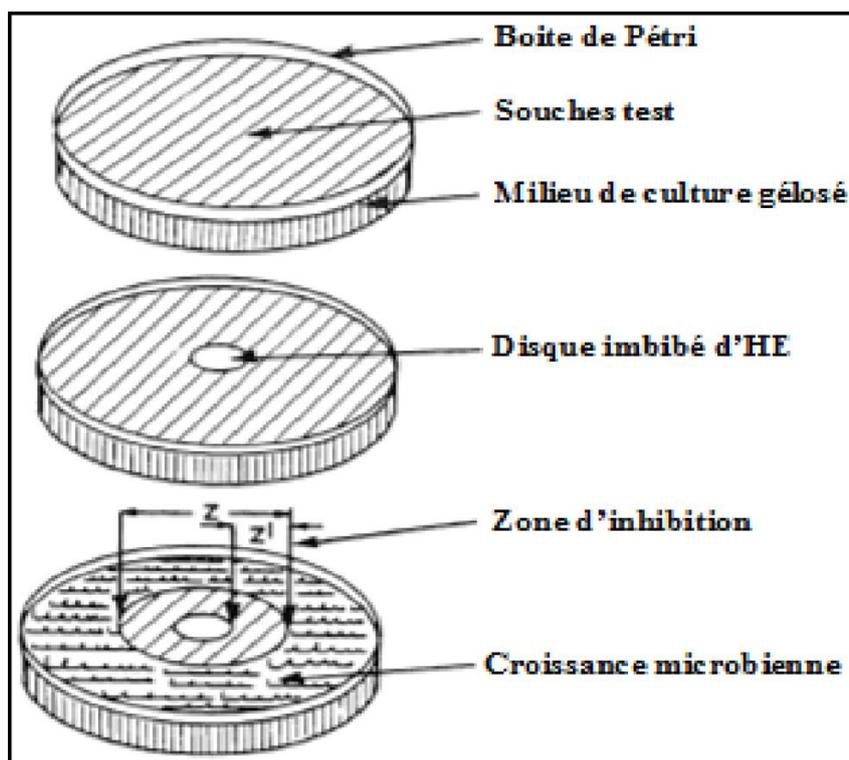
- ✓ Couler la gélose de Mueller-Hinton dans les boîtes de pétrie jusqu'à 2mm d'épaisseur.
- ✓ Préparation de l'inoculum : A partir des boîtes contenant les germes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).

A partir des pré-cultures congelées, on racle 3 colonies à l'aide d'une pipette pasteur, puis on la décharge dans un tube qui contient l'eau physiologique stérile. On dépose 3 à 5 gouttes de suspension bactérienne, préparer sur la gélose coulée dans un boîte de pétrie, on obtient ainsi, un étalement uniforme en nappe.

• **Préparation des dilutions de l'HE :** On prépare 2 tubes en verre stériles (1/2,1/4) ; le premier contient 500µl de DMSO et 500 µl de diluant .On ajoute dans le deuxième tube (1/4) 500 µl du premier tube (1/2) et 500 µl DMSO. Les tubes sont par la suite bien agités

• **Préparation des disques :** Le papier Whatman est coupé en disques de 6mm, qui doivent posséder un contour régulier pour donner une zone d'inhibition que l'on peut mesurer facilement Ces disque sont stérilisés dans un autoclave pendant 20minutes à120°C.

• **Application des disques :** On utilise une pince stérile pour mettre les disques dans le boîte de pétrie, à l'aide d'une micropipette on imbibe chaque disque par 10µl d'échantillon : le première disque pour l'huile essentielle pure, et le deuxième pour la dilution 1/2, et la troisième pour la dilution 1/4. Les boîtes de petri sont incubés à 37C° pendant 24 heures.



**Figure 19** : Illustration de la méthode d'aromatogramme (Amara et al., 2017)

- **Lecture de l'aromatogramme**

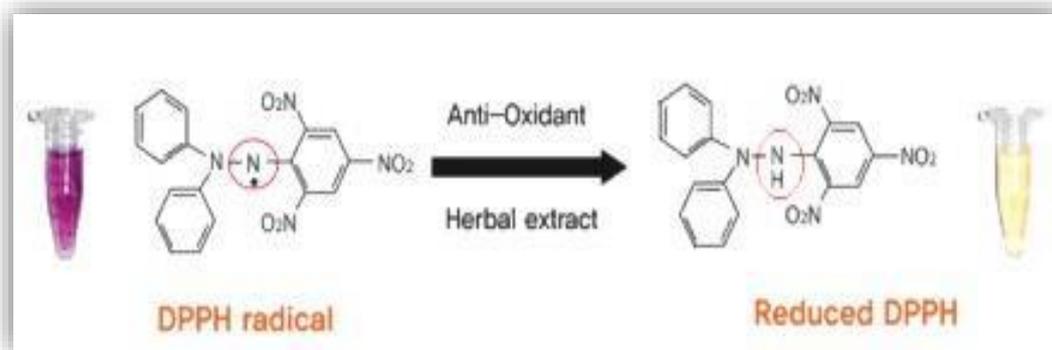
La lecture se fait après incubation à 36-37°C pendant 18h à 24h, on mesure le diamètre de zone d'inhibition autour de chaque disque en millimètre ; D'après **Ponce et al. (2003)**. Les résultats peuvent être symbolisés par des signes selon la sensibilité des souches vis à vis de huiles essentielles (**Bouguerra et al., 2014**)

- Extrême sensible (+++),  $ZI \geq 20\text{mm}$  ;
- Très sensible (++) ,  $15\text{ mm} \leq ZI \leq 19\text{ mm}$  ;
- Sensible (+),  $9\text{ mm} \leq ZI \leq 14\text{ mm}$ ,
- Non sensible (-),  $ZI < 8\text{mm}$ .

#### **II.4. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles par le test de 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 20**), 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 20** : La forme radicale du DPPH et sa réduction par un antioxydant (Boucekrit, 2018)

### ➤ Mode opératoire

La capacité de l'extrait de plante à piéger les radicaux libres 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) a été évaluée en utilisant la méthode décrite par (Bouhaddouda, 2016), suivi du calcul de l'IC50. La solution mère de l'extrait de plante a été préparée dans du méthanol pour atteindre la concentration de 2000 µg / ml. De plus, des dilutions au double ont été effectuées pour obtenir des concentrations différents de 1000 µg / ml à 7,81 µg / ml. Des solutions diluées d'extrait (500 µl chacune) ont été mélangées avec 500 µl de solution méthanoïque de DPPH (80 µg/ml).

Après 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été lue dans un spectrophotomètre à 515 nm. Les échantillons témoins consistaient en 500 µl de méthanol ajoutés à 500 µl de solution de DPPH. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif.

L'activité antioxydante est exprimée comme le pourcentage d'inhibition calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité Antioxydant (\%)} = 100 \times [(A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle}]$$

; Où :

**A contrôle** : représente l'absorbance de l'échantillon contrôle.

**A échantillon** : représente l'absorbance de l'huile essentielle.

*La concentration inhibitrice (IC50)* est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Elle est calculée à partir du graphe de l'activité antioxydant (en %) en fonction de différentes concentrations de l'extrait testée. Une faible valeur d'IC50 indique une forte capacité de l'extrait à agir comme piègeur du DPPH.

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Screening phytochimique

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des parties aériennes des deux espèces sélectionnées, par des réactions qualitatives de caractérisation, a permis de mettre en évidence la présence de différents groupes chimiques. Les résultats obtenus sont résumés dans **le tableau 07**

**Tableau 07** : Les résultats du screening phytochimique

Composés phytochimiques recherchés	<i>Origanum majorana</i> L.	<i>Mentha spicata</i> L.
Tanins	+	+
Tanins galliques	+	+
Alcaloïdes	-	-
Flavonoïdes	+	+
Saponosides	+	-
Glycosides	+	+
Amidon	-	-

**+ : Présence ; - : Absence.**

Les résultats des tests phytochimiques (**tableau 07**) ont révélé la présence de plusieurs composés phytochimiques tels que les tanins, tanins galliques, les flavonoïdes, les saponosides, et les glycosides. Cependant, les deux espèces se sont caractérisées par l'absence totale des composés azotés (les alcaloïdes) dans leurs parties aériennes.

Ces résultats sont en accord avec ceux d'**Al-Howirini (2009) et Vasudeva (2015)** qui ont révélé la présence et l'absence des mêmes groupes chimiques dans les feuilles d'*Origanum majorana*. La présence de ces métabolites secondaires au niveau de la plante étudié explique son fort pouvoir thérapeutique. Effectivement, les tanins, les flavonoïdes, les saponosides possèdent plusieurs propriétés bénéfiques pour la santé notamment les propriétés antioxydantes, anti inflammatoires et antimicrobiennes (**Bouhaddouda et Labiod, 2016**). Ces résultats justifient la large utilisation de cette plante en médecine traditionnelle par la population locale.

Par contre, **Zaidi et Dahiya (2015)** en analysant les constituants phytochimiques de l'extrait des feuilles de *Mentha spicata* ont révélé la présence des alcaloïdes et l'absence des tanins. Ces résultats sont en désaccord avec les nôtres.

Toutefois, ces résultats peuvent être expliqué par une différence au niveau de plusieurs paramètres soient géographiques, physicochimiques ou biologiques tels que : la différence du

site de récolte y compris l'environnement de la plante, la lumière, les précipitations, la topographie, la saison, type de sols, période de récolte, le patrimoine génétique, la procédure d'extraction utilisée, la partie de la plante étudiée ou leurs produits phytochimiques (Malik et al., 2012 ; Sujana et al., 2013 ; Akhtar et al., 2015).

### III.2 Rendements en huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle des feuilles d'*Origanum majorana* et *Mentha spicata* par hydrodistillation, a donné un rendement de **1.493%** et **1.208%**, respectivement. Nous avons rassemblé dans le **tableau 08**, les rendements obtenus de différents travaux réalisés en Algérie et dans quelques pays, afin de pouvoir faire une étude comparative avec notre résultat.

**Tableau 08** : Rendements en huiles essentielles en Algérie et dans le monde

Espèces	Origine	Rendements	Références
<b>HE</b> <i>Origanum majorana</i>	Maroc (Meknès)	2.19%	El idrissi et al. (2014)
	Egypte	0.73 %	Ragab et al. (2019)
	Tunisie	1.7%	Ben Salha (2020)
	Algérie (Oued Souf)	1.158%	Djebali et Khalfaoui (2020)
<b>HE</b> <i>Mentha spicata</i>	Algérie (Bejaia)	1.1%	(Brahmi et al., 2016
	Algérie (Sétif)	0.9%	(Boukhebti et al., 2011)

Nous constatons d'après le **tableau 08**, qu'en Algérie, le rendement le plus élevé a été obtenu par notre huile essentielle de la région d'Ain Defla (**1.493%**) suivi par celui de la région d'Oued Souf (1.158%) (Djebali et Khalfaoui, 2020).

En dehors de l'Algérie, le plus grand rendement en huile essentielle est obtenu par la marjolaine originaire du Maroc (2.19 %) (El idrissi et al., 2014), il est d'ailleurs nettement plus important que les rendements de l'espèce algérienne. Il est suivi par celui obtenu en Tunisie (1.7 %) (Ben Saha, 2020). tandis que le taux le plus faible est celui de l'Egypte qui est de l'ordre de 0.73 % (Ragab et al., 2019),

La méthode appliquée dans notre étude est celle de Clevenger qui est décrite dans la Pharmacopée européenne et dans la 9ème édition de la Pharmacopée française, caractérisée par un rendement plus élevé. Ceci dit, le taux obtenu dans ce présent travail peut être justifié par les conditions climatiques du milieu de culture qui est sec.

La variations dans les rendements d'extraction peut également être attribuée à plusieurs facteurs dont essentiellement, l'origine, l'espèce, la période de récolte, la durée de séchage, cycles végétatifs, la technique d'extraction d'HE (Russo. et al ; 1998 ; Van Damme, 2001 ; Karousou. et al., 2005 ; Loziene. et al., 2005 ; Pibiri, 2005 ; Curado. et al., 2006).

Par ailleurs, le rendement d'extraction de la menthe (*Mentha spicata*) est de l'ordre de 1.208 %. Un taux nettement supérieur à ceux trouvés dans d'autres régions, Bejaia avec un rendement de 1.1% (Brahmi et al., 2016), Sétif de 0.9% (Boukhebti et al.,2011).

Ces variations de teneurs peuvent être dues à plusieurs facteurs notamment la saison de récolte et les conditions environnementales (Hussain et al., 2010) ; l'écotype, la phénopase, la température, l'humidité relative, la photopériode, l'éclairement, le génotype et les conditions agronomiques (plantation, temps de récolte et densité des cultures) ( Snoussi et al., 2015).

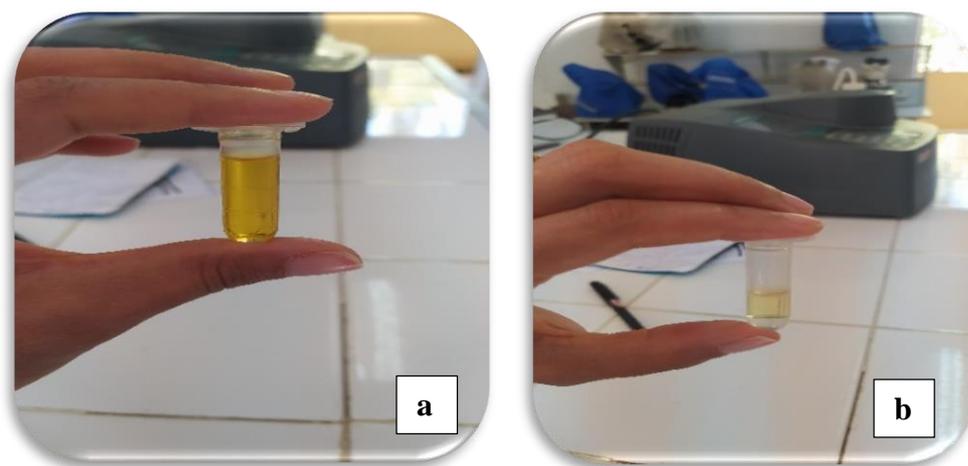
### III.3. Caractérisation des huiles essentielles

#### III.3.1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques de nos huiles essentielles sont présentées dans le tableau 09 et la figure 21.

**Tableau 09 :** Caractéristiques organoleptiques de nos huiles essentielles.

Caractéristique Espèces	Odeur	Couleur	Aspect physique
<i>Origanum majorana</i>	Fortement aromatique, avec une saveur piquante, caractéristique de l'origan	Jaune foncé	Liquide
<i>Mentha spicata</i>	Aromatique âcre, caractéristique de la menthe.	Jaune pâle	Liquide



**Figure 21** : Aspect des huiles essentielles des deux plantes (a) *Origanum majorana* et (b) *Mentha spicata*

Après l'extraction nous avons obtenus une huile essentielle liquide de couleur jaunâtre à brun foncé avec une odeur fortement aromatique, avec une saveur piquante et caractéristique de l'origan. Ces résultats sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes **AFNOR (2000)**.

Quant à l'huile essentielle de la menthe, elle présente un aspect un liquide incolore à jaune pâle avec une odeur aromatique âcre, caractéristique de la menthe. Ces résultats sont semblables à ceux trouvés dans la littérature (**Bardeau, 2009 ; Sylvain, 2010**).

### III.3.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques telles que : l'indice de réfraction, le pH, l'indice d'acide, l'indice d'ester...etc., constitue un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle (**AFSSAPS, 2008**).

Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles analysées ont été déterminées selon les normes de l'association française de normalisation (AFNOR). Les moyennes des paramètres étudiés sont représentées dans le **tableau 10**

**Tableau 10 :** Caractéristiques physico-chimiques de nos huiles essentielles.

Paramètres physico-chimiques		Résultats obtenues <i>Origanum</i>	Résultats obtenues <i>Mentha</i>
Indice chimique	Indice d'acide	<b>1.54</b>	<b>1.12</b>
Indices physiques	Indice de réfraction	<b>1.5</b>	<b>1.48</b>
	PH	<b>02</b>	<b>4.5</b>

- **Les indices chimiques**

Pour la menthe l'indice d'acide n'a été indiqué que par **Bardaweel et al. (2018)** et **Suliman et al. (2011)** dont la valeur trouvée par ce premier (1.30) est nettement supérieure à celle trouvée par ce deuxième (0.0614).

Ce paramètre donne une idée sur le taux d'acides libres, nous constatons que l'huile essentielle de *M. spicata* et d'*O. majorana* contiennent un faible taux, qui de plus est, inférieur à 2, ce qui indique selon **AFNOR (2000)**, une preuve de bonne conservation des 2 huiles essentielles.

- **Les indices physiques**

• **L'indice de réfraction (IR)**

L'indice de réfraction de l'HE d'*Origanum majorana* obtenu est de 1,5. L'indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. (**Mazouz et Hahdaoui, 2010**)

• **Le PH**

Le pH indique que notre huile essentielle est presque neutre. Cette conformité est dus à la pureté de notre l'huile (bien séparé de l'eau). Le pH d'extrait aqueux de la plante est proche du pH de l'HE, ce qui montre que l'HE de l'*Origanum majorana* L. influe sur le pH de ce dernier.

Les propriétés physiques de l'échantillon de l'HE de *Mentha spicata* analysé oscillent dans des intervalles comparables aux normes témoignant ainsi la bonne qualité de notre huile essentielle (**AFNOR**).

**III.4. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par CG-MS**

**III.4.1. Analyse de l'huile essentielle de l'origan (marjolaine) par CG-MS**

## Résultats et discussion

La composition chimique de l'huile essentielle a été analysée à l'aide de CG-MS, ce qui a permis de comparer les temps de rétention relatifs et les spectres de masse des composants de l'huile avec ceux stockés dans les données de la Wiley Mass Spectral Library. Les composés identifiés et leurs proportions relatives sont répertoriés dans le **tableau 11**.

**Tableau 11 : Composants de l'HE d'*Origanum majorana* L.**

Name	Temps de rétention (min)	Pourcentage de Concentration (%)
Thujene <alpha->	7.051	0.23
alpha-Pinene dimer	7.231	1.41
1-Octen-3-ol	8.323	0.20
Amyl ethyl ketone	8.516	0.05
Myrcene	8.633	0.84
3-OCTANOL	8.745	0.05
$\alpha$ -Phellandrene	9.008	0.13
(+)-3-Carene	9.167	0.04
$\alpha$ -Terpinene	9.325	1.53
Cymene <para->	9.527	3.44
<u>Limonene</u>	9.647	0.42
Ocimene <(E)-, beta->	10.123	0.04
$\gamma$ -Terpinene	10.445	13.12
1-NONEN-3-OL	10.942	0.06
<u><math>\alpha</math>-Terpinolene</u>	11.224	0.11
Linalool	11.481	1.51
Borneol	13.297	0.06
Terpinen-4-ol	13.575	0.20
O-Acetylthymol	16.364	6.80
D-(+)-Carvone	16.673	67.61
$\alpha$ -Gurjunene	19.309	0.26
Caryophyllene	19.549	0.22
<u>(-)-Spathulenol</u>	19.993	0.18

Au vu de ces résultats, l'analyse chromatographique par CG-MS de l'huile essentielle marjolaine a permis d'identifier 32 composés ce qui représente 100 % de l'huile essentielle

complète. L'huile est composée majoritairement de vingt-quatre composés monoterpéniques (98.9 %) et de huit composés sesquiterpéniques (1.1 %). Cette huile était caractérisée par la présence de D-(+)-Carvone (67.61%),  $\gamma$ -Terpinene (13.12%), O-Acetylthymol (6.80%),  $p$ -cymene (3.44%),  $\alpha$ -Terpinene (1.53%), Linalol (1.51%),  $\alpha$ -pinene (1.41%), Myrcene (0.84%), Limone (0.42%), Ledene (0.34%),  $\alpha$ -Gurjunene (0.26%),  $\alpha$ -Thujene (0.23%), et Caryophyllene (0.22%).

**Ahmed Abd El Malek et Yagouni (2017)**, ont analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à spectrométrie de masse (CG-MS) l'huile essentielle d'*Origanum majorana* de la région de Ben Allal (Ain Defla). L'huile était très riche en 4-terpinéol (13.94%), terpinolène (9.43%),  $\alpha$ -Terpinène (8.80%), Sabinène (5.14%), et  $\gamma$ -Terpinène (4.78%).

Par ailleurs, **Chenna et al., (2018)** ont rapporté que 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%),  $\alpha$ -terpinène (2.6%) et 3-carène (1.77%)

Quant à l'analyse par GC/SM de l'HE d'*O. majorana* récoltée au mois de juillet à El-Oued par **Bernaoui et Louetri. (2018)**, 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-(II)(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%).

Les données ci-dessus peuvent être importantes dans la classification chimiotaxonomique de l'*O.majorana* Algerien. Dans le même temps, la plante Algérienne a donné un excellent rendement qui peut être attribué à des facteurs environnementaux.

En outre, **Nahida et al. (2007)** ont rapporté que les composés les plus importants de l'huile essentielle des feuilles d'*Origanum majorana* étaient respectivement le terpinène-4-ol (47,4 %), le  $\gamma$ -terpinène (16,4 %), l' $\alpha$ -terpinène (7,9 %) et l' $\alpha$ -terpinéol (6,4 %). Nos résultats montrent une forte similarité avec ces recherches.

**Soliman et al. (2009)** ont rapporté également que l'analyse par GC/MS de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* cueillis en Egypte a permis d'identifier 15, 15, 11 et 14 composants dans les huiles préparées respectivement au printemps, en été, en automne et en

hiver. La composition des huiles essentielles différait quantitativement et qualitativement selon le moment de la collecte. Le thymol (38,4 %) et l'hydrate de cis-sabinène (25,3 %) étaient les principaux composants des plantes printanières. Le terpinène-4-ol (37,4 %, 20,5 %, 16,3 %) était un composant majeur dans les huiles d'été, d'automne et d'hiver, respectivement. L'hydrate de cis-sabinène (54,4%) était un élément majeur dans les plantes d'hiver tandis que le terpinolène (43,1%) était le principal composant des plantes d'automne. D'autres composants détectés en quantités inférieures dans tous les échantillons d'huile étaient le sabinène et le p-cymène (jusqu'à 7,4 % et 13,9 % en automne) et l' $\alpha$ -terpinène (jusqu'à 13,3 % en été). Ces résultats sont en accord avec les nôtres, vu la présence de ces composés dans la marjolaine récoltés à Ain Defla.

De plus, **Mossa et Nawwar (2011)** ont rapporté que les composants les plus importants étaient le 4-terpinéol (29,97 %), le  $\gamma$ -terpinène (15,40 %), l'hydrate de trans-sabinène (10,93), l' $\alpha$ -terpinène (6,86 %) et le 3-cyclohexène-1-1 méthanal,a,a4 -triméthyl-,(S)-(CAS) (6,54%). Ils constituaient environ 69,70% du total des huiles essentielles.

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%),  $\gamma$ -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 terpinen4-ol (31%) était le principal composé, suivi du cis-sabinene hydrate (16%),  $\gamma$ -terpinene (13%),  $\alpha$ -terpinene (6%) et sabinene (6%) (**Sedlaříková 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**).

Au meilleur de nos connaissances, il existe de nombreuses recherches sur la composition chimique des huiles isolées des espèces d'*Origanum* (**Falco et al., 2013 ; Morshedloo et al., 2018**). Ces recherches indiquent que la composition chimique de l'huile d'*Origanum* existe sous deux formes, l'une contient du terpinène-4-ol et du sabinène hydrate comme composants majeurs tandis que l'autre contient du thymol et/ou du carvacrol comme composés prédominants.

L'huile essentielle de marjolaine a montré que la composition aromatique volatile varie selon l'origine de la plante, les différentes conditions environnementales et climatiques, à la période de récolte, 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**).

### III.4.2. Analyse de l'huile essentielle de *Mentha spicata* L. par CPGMS

L'analyse chromatographique par CG/MS de l'HE de la menthe provenant de la région de Djendel (*Mentha spicata*) a permis d'identifier composés (%). Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 12**.

**Tableau 12 : Composants de l'HE de *Mentha spicata* L.**

<b>Pics</b>	<b>Nom du composé</b>	<b>Temps de rétention</b>	<b>Pourcentage de concentration</b>
2	Camphene	6.443	0.06
4	Sabinene	7.291	0.24
5	β-Pinene	7.374	0.39
6	Camphene	7.596	0.05
7	Myrcene	7.877	0.23
8	3-OCTANOL	8.044	0.18
11	Myrcene	8.623	0.19
13	3-OCTANOL	8.734	0.15
14	ρ-Cymene	8.902	0.08
16	Eucalyptol	9.139	2.45
19	Eucalyptol	9.731	2.06

#### **Total identifié :**

- **Monoterpènes : 77.67 %**
- **Sesquiterpènes 20.28 %**
- **Autres : 2.05 %**

Les résultats de l'enquête par CG-MS de l'huile essentielle de *M. spicata* est présenté dans le tableau 1 et la figure 1. Selon ces résultats, 78 composés ont été identifiés par GC-MS, représentant 97,95 % de l'huile essentielle entière. Les monoterpènes représentent 77.67 % de l'huile essentielle, les sesquiterpénoïdes 20.28 % et le pourcentage restant (2.05 %) est constitué d'alcools aliphatiques, d'aldéhydes, d'esters, d'hydrocarbures et de cétones. Les principaux composants étaient la carvone (43.05%), *neo-iso-dihydrocarveol* (8.53 %), le limonène (6.68%), transcarveol (4.84%), D-Germacrene (4.93%), Eucalyptol (4.51%), terpinène-4-ol (1.85 %) le caryophyllène (1,64%), trans-4-thujanol (1.47%), le cis-dihydrocarvone (0,49%), et le p-menth-2-en-1-ol (0.06%) Nos résultats sur les composés chimiques les plus abondants

de l'huile essentielle de *M. spicata* collectés dans le nord-ouest de l'Algérie sont conformes aux études précédentes (Shahi et al., 2007 ; Shahbazi, 2015).

Chauhan et al. (2009) ont rapporté que les carvones étaient les principaux composants de l'huile essentielle collectée en Inde. Les autres constituants de leur huile essentielle étaient le limonène, le 1,8-cinéole, le Z- $\beta$ -ocimène et le cis-muurolo-4. De même pour Mahboubi et Haghi (2008) ; Sertkaya et al. (2010) ont rapporté que les carvones étaient les principaux constituants de l'huile essentielle de *M. spicata*. De plus, Govindarajan et al. (2012) ont étudié la composition chimique de *M. spicata* obtenu à Tamil Nadu, en Inde, et ont rapporté que le carvone (48,60 %), le cis-carvéol (21,30 %) et le limonène (11,30 %) étaient les principaux composants. Contrairement à nos résultats, Telci et al. (2010) ont étudié l'activité antibactérienne et la variation environnementale de la composition chimique de *M. spicata* et ont indiqué que la pulégone et la pipéritone étaient les principaux composants.

En règle générale, les différences observées dans la composition chimique de l'huile essentielle, par rapport aux études précédentes, pourraient être attribuées à plusieurs facteurs, notamment les différentes méthodes utilisées pour l'extraction de l'huile essentielle, les conditions géographiques, le climat et les variations saisonnières, ainsi que l'espèce et le stade de la croissance des plantes et du traitement des matières végétales avant l'extraction de l'huile (Brut, 2004 ; Brut et al., 2005 ; Mahboubi et Haghi, 2008 ; Liang et al., 2011, Moosavy et Shavisi, 2013)

### III.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

L'action et l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum majorana* et de *Mentha spicata* s'appliquent sur trois bactéries, que ce soit à Gram positives ou à Gram négatives. Les résultats de cette étude sont mentionnés dans le **tableau 13** et le **figure 22, 23, 24 et 25**

**Tableau 13 :** Résultat de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* et *Mentha spicata* en exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm

Souches bactériennes	<i>Origanum majorana</i>			<i>Mentha spicata</i>		
	HE pure	1/2	1/4	HE pure	1/2	1/4
<i>Staphylococcus aureus</i>	45 mm (+++)	50 mm (+++)	15 mm (++)	13 mm (+)	31 mm (+++)	40 mm (+++)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11 mm (+)	25 mm (+++)	15 mm (++)	06 mm (-)	13 mm (+)	06 mm (-)
<i>Escherichia coli</i>	30 mm (+++)	34 mm (+++)	20 mm (+++)	7 mm (-)	30 mm (+++)	25 mm (+++)

(+++) Extrême sensible, (++) Très sensible, (+) sensible, (-) Non sensible.

### III.5.1. Résultats de l'aromatogramme

- Pour l'origan

L'HE de l'origan a présenté, *in vitro* une bonne activité inhibitrice sur la croissance des trois souches bactériennes, les zones d'inhibitions obtenues oscillent entre 50, 25 et 34 mm pour les disques imbibés dans l'HE dilué (1/2).

Les résultats obtenus montrent également que l'HE pure d'*Origanum majorana* a une activité antimicrobienne importante vis-à-vis des souches testées. Parmi la bactérie Gram +, c'est *Staphylococcus aureus* qui a été extrêmement sensible (+++) inhibée fortement par l'HE étudiée avec une zone d'inhibition de 45 mm

Concernant les bactéries Gram négatives, les deux souches se sont avérées être sensibles à l'action de l'HE pure de la marjolaine avec des zones d'inhibition de (30mm) pour *Escherichia coli* et (11mm) pour *Pseudomonas aeruginosa*.

D'après ces résultats on remarque qu'indépendamment de la nature de l'huile essentielle ou de sa concentration, les bactéries à Gram(-) présentent une certaine résistance.

Les résultats obtenus par **Ben Salha (2020)** révèlent que les huiles essentielles de la marjolaine se comportent de la même manière contre la croissance des bactéries Gram + (*Staph 2*), les bactéries Gram – (*AH2*, *E.coli*, *S.typhi*, *P.aeru*, *V.algi*, *V.angui*) et la levure (*C.albi*). Ces résultats sont en désaccord avec plusieurs travaux antérieurs signalant que les agents antibactériens sont généralement plus actifs sur les bactéries Gram + comparativement aux bactéries Gram –. En effet, cette résistance des bactéries Gram- est en relation avec la nature de leurs membranes externes (imperméable à la plupart des agents biocides) (**Faucher et Avril, 2002 ; Aiche-Iratni, 2016**). Cette observation est également rapportée vis-à-vis des huiles essentielles.

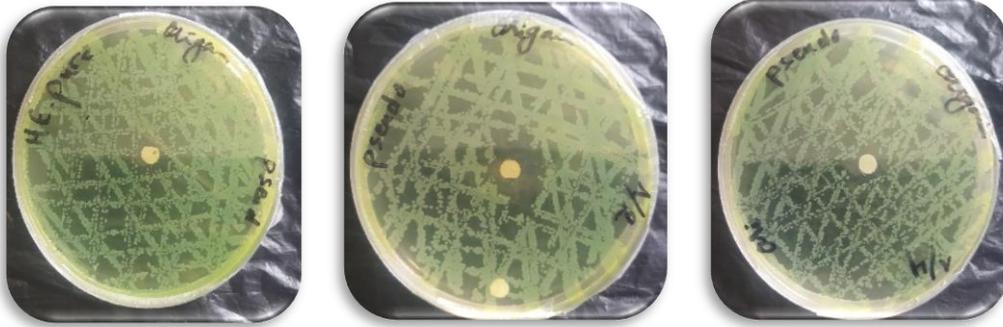
- **Pour *Mentha spicata***

Les figures **22,23, 24, 25 ainsi que le tableau 12**, montrent que l'huile essentielles pure et les dilutions (1/2 et 1/4) ont exercé un effet inhibiteur (+) sur les trois souches bactériennes testées. Ceci dit les souches bactériennes ont été plus sensibles à la dilution (1/2) de l'huile essentielle.

La souche la plus sensible est *Staphylococcus aureus* étant donné que le diamètre de la zone d'inhibition est le plus grand (31 mm), suivi de très très près par *Escherichia coli*, avec un diamètre de 30mm, et enfin *Pseudomonas aeruginosa* avec seulement 13 mm de diamètre ; faisant de celle-ci la souche la moins sensible par rapport aux deux autres. Nos résultats sans tout d'accord avec celle de **Laggoune et al. (2016), Saba et Anwar (2018)**.

Par ailleurs, dans cette étude, les diamètres des zones d'inhibition varient d'un échantillon d'huile à l'autre, ils dépendent essentiellement de la capacité de diffusion des différents composés contenus dans le milieu gélosé. D'où, cette variation est attribuée à la variation de la composition chimique et à la polarité des substances diffusibles (**Carneiro et al., 2008**).

Fait intéressant, les rapports de la littérature sur l'association entre la composition phytochimique de l'huile essentielle et son activité antimicrobienne s'avèrent être en grande cohérence avec les résultats de la présente étude. En particulier, les monoterpènes oxygénés ont été manifestement signalés comme de puissants agents antimicrobiens dans la composition de plusieurs huiles essentielles (**Bardaweel et al., 2018**). De plus, il a été démontré que le 1,8-cinéole et les sesquiterpènes présentent une activité antimicrobienne considérable contre un large éventail de bactéries Gram-positives et Gram-négatives (**Bardaweel et al., 2018**). Cependant, comme les huiles essentielles contiennent de multiples composants, leurs activités antimicrobiennes sont plutôt dues aux effets additifs, synergiques ou antagonistes des composants individuels.

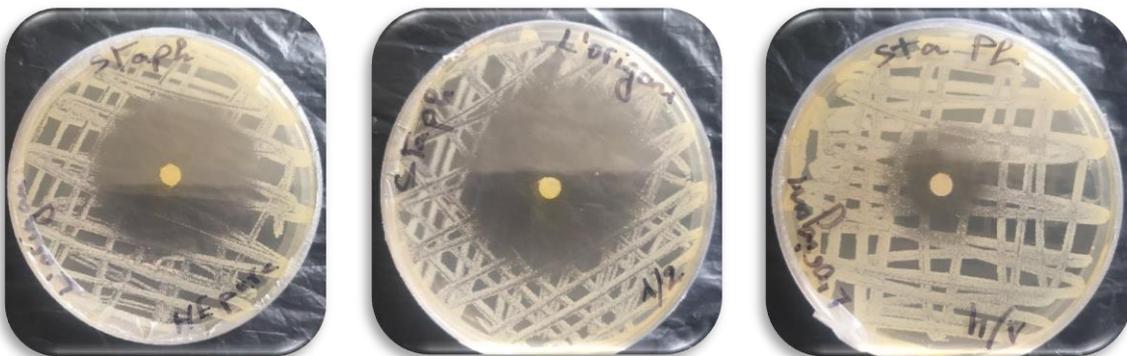


*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



*Escherichia coli* ATCC 25922

Figure 22 : Sensibilité des souches bactériennes Gram négatives testées vis-à-vis de l'huile essentielle de l'*Origanum majorana* (Originale, 2022)

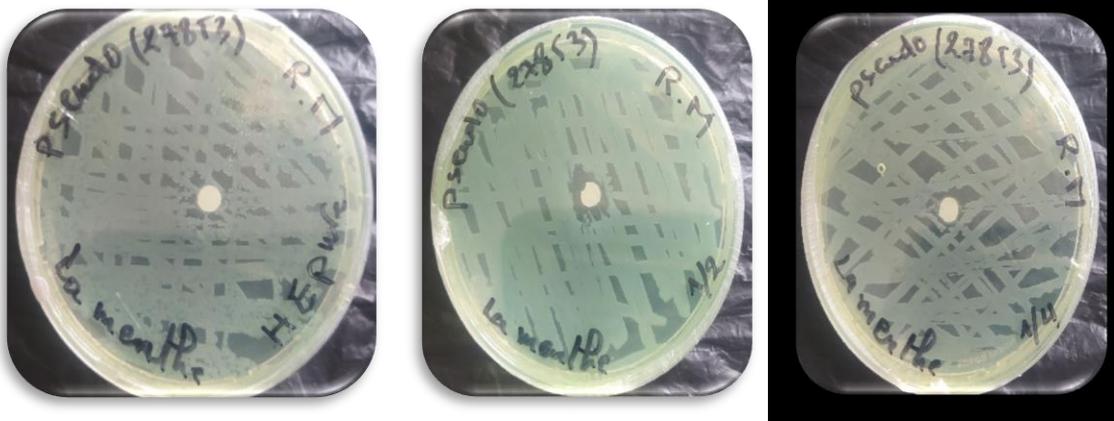


*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Figure 23 : Sensibilité de la souche bactérienne Gram positif testée vis-à-vis de l'huile essentielle de l'*Origanum majorana* (Originale, 2022)



*Escherichia coli* ATCC 25922



*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Figure 24 : Sensibilité des souches bactériennes Gram négatives testées vis-à-vis de l'huile essentielle de *Mentha spicata* (Originale, 2022)



*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Figure 25 : Sensibilité de la souche bactérienne Gram positif testée vis-à-vis de l'huile essentielle de *Mentha spicata* (Originale, 2022)

### III. 6. Evaluation de l'activité antioxydante in vitro par le test de DPPH

Les activités antioxydantes des huiles essentielles (*Origanum majorana* et *Mentha spicata*) et celle de l'acide ascorbique sont illustrée sur les figures 26 et 27.

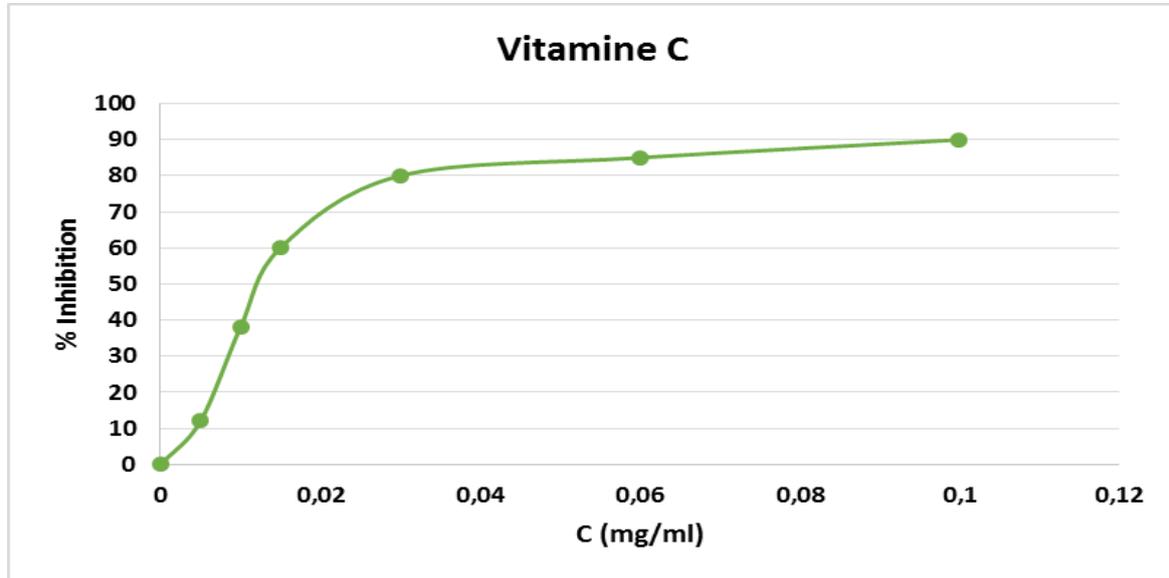


Figure 26 : Pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique (vitamine C) par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

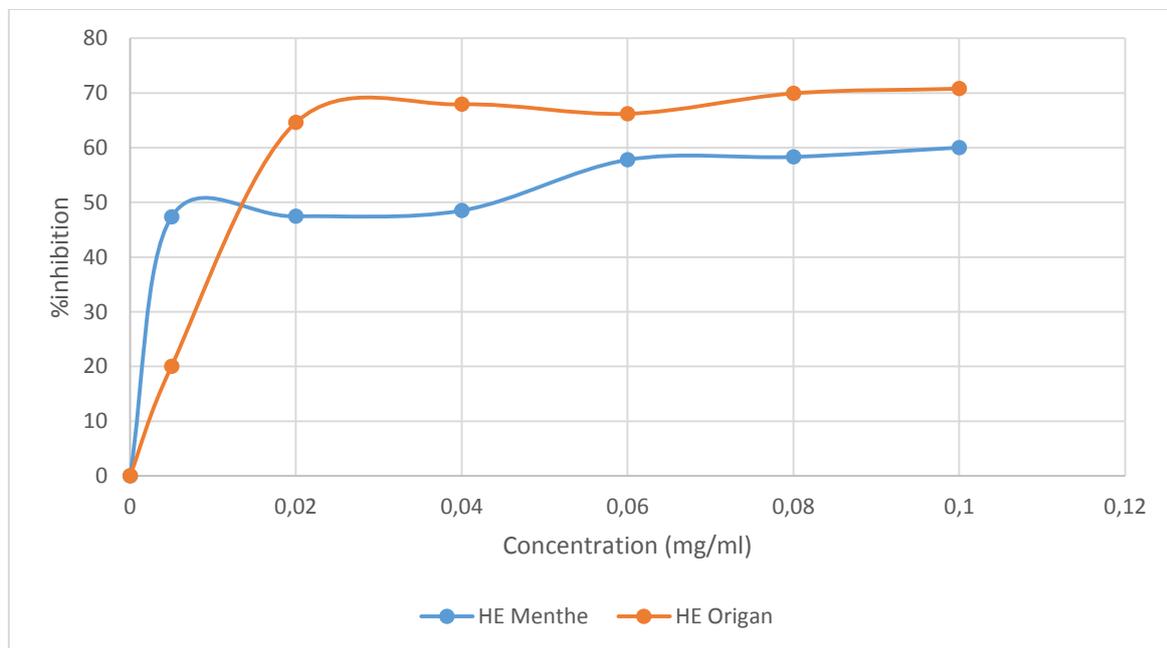


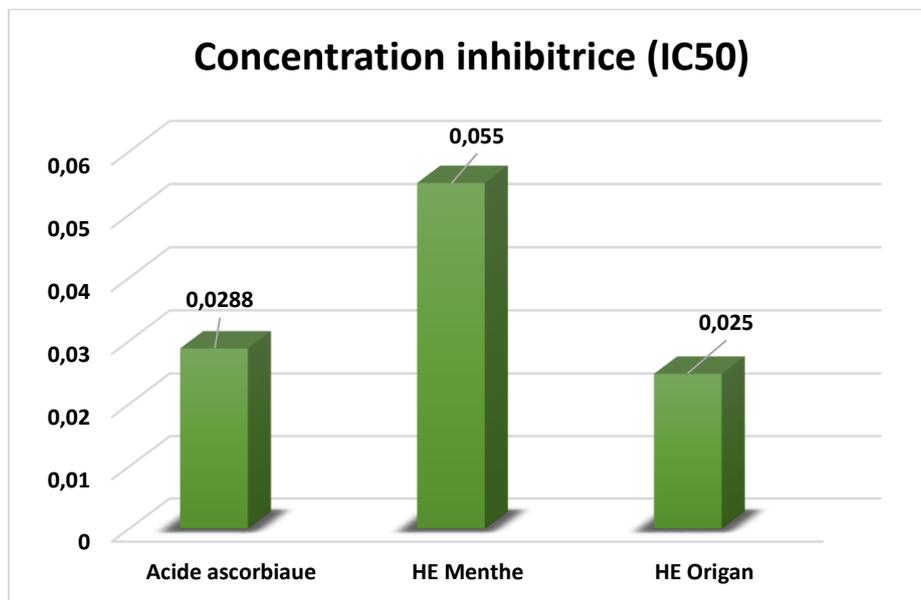
Figure 27 : Pouvoir antioxydant de l'HE *Origanum majorana* et l'HE *Mentha spicata* par la méthode du piégeage du radical libre DPPH. .

Les résultats montrent que les huiles essentielles des deux espèces étudiées et l'antioxydant de référence (l'acide ascorbique) ont inhibé de manière dose dépendante le radical DPPH à toutes les concentrations testées c'est-à-dire que l'inhibition augmente avec l'augmentation de la

concentration de l'échantillon dans le milieu réactionnel. Il ressort également de ces résultats que le pourcentage d'inhibition augmente progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement total du DPPH présent dans le milieu.

Par ailleurs, nous remarquons qu'à une concentration de 0.1mg/ml, une importante activité antioxydante de l'huile essentielle de la marjolaine a été observée avec un pourcentage d'inhibition plus important que celui de l'huile essentielle de la menthe (70.78 et 60.06 %, respectivement). Alors qu'à la même concentration, l'acide ascorbique a montré un fort pouvoir antioxydant qui se traduit avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 90%

Pour une meilleure illustration de l'activité antioxydante, nous avons déterminé la valeur de la concentration inhibitrice qui donne 50% de l'activité de piégeage du radical libre DPPH ( $IC_{50}$ ) correspondant respectivement à l'acide ascorbique (Vitamine C) et huiles essentielles. Ces derniers sont regroupés dans la **figure 28**.



**Figure 28** : Concentration inhibitrice ( $IC_{50}$ ) de l'acide ascorbique, de l'HE de la marjolaine et l'HE de la Menthe

La valeur d' $IC_{50}$  est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (Activité antioxydante I%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d' $IC_{50}$  est faible, plus l'activité anti-radicalaire d'un composé est appréciable

Ainsi d'après les résultats de la **Figure 28**, l'huile essentielle d'*Origanum majorana* avec une  $IC_{50}$  de 0.025 mg/ml possède une activité antioxydante similaire à celle de l'acide ascorbique dont l' $IC_{50}$  est de 0.028 mg/ml.

La forte activité de l'HE peut être due à sa richesse en composés phénolique (**fleurentin 2007**), ses derniers ont la capacité de piéger les radicaux libres. D'ailleurs, plusieurs travaux montrent que les composés phénoliques jouent un rôle important dans l'extraction des radicaux libres en plus tous ses composant d'HE d'Origan pourraient exercer à côté d'autres composés mineures, un effet synergie entre eux donneraient une activité antioxydante importante (**loizzo et al., 2009**).

## **Conclusion générale**

---

#### IV. Conclusion générale

Dans le cadre de la valorisation des espèces végétales algériennes à caractères thérapeutiques, nous sommes intéressées à l'étude de la marjolaine « *Origanum majorana* » et la menthe « *Mentha spicata* » espèces très répandues et spontanées en l'Algérie par l'évaluation des activités antibactériennes et antioxydantes des huiles essentielles.

L'extraction par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger, a révélé un rendement de 1.493% pour l'huile essentielle de la marjolaine et de 1.208% pour l'huile essentielle de la menthe de la menthe.

A la lumière des résultats obtenus, le screening phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de mettre en évidence des tanins, des flavonoïdes, des glucosides, des saponosides. Ces métabolites secondaires sont connus par leurs larges effets pharmacologiques. La qualité de l'huile essentielle a été évaluée par la détermination des indices physico-chimiques : indice de réfraction, indice d'acide et le Ph. Ces résultats montrent qu'ils préservent les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles et reflètent leur bonne qualité.

En outre, l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de l'*Origanum majorana* et de *Mentha spicata* montre que ces huiles essentielles possèdent des activités antimicrobiennes importantes vis-à-vis des souches testées avec des zones d'inhibitions intéressantes. Ainsi les diamètres des zones d'inhibitions chez la bactérie Gram + sont oscillés chez *Staphylococcus aureus* entre 50 mm pour l'HE de la marjolaine et 31 mm pour l'HE de la menthe. Chez les bactéries à Gram négatives, les diamètres des zones d'inhibitions exercé par l'HE de la marjolaine ont été comprises entre 25 mm pour *Pseudomonas aeruginosa* et 34 mm pour *Escherichia coli*, Tout comme pour la Menthe où les zones d'inhibitions ont été comprises entre 13 mm chez *Pseudomonas aeruginosa* et 30 mm chez *Escherichia coli*.

Par ailleurs, l'activité antioxydante de l'HE d'*O. majorana* par la méthode du piégeage du radical libre DPPH s'est exprimé par une faible valeur d'IC50 (0.025 mg/ml) comparativement à celle de l'HE de la menthe (IC50 = 0.055 mg/ml). Ce résultat témoigne d'une capacité réductrice remarquable et comparable à celle de l'acide ascorbique (0.028 mg/ml).

En conclusion, nous pouvons dire que, le présent travail peut être considéré comme une source d'information sur les propriétés physico-chimiques, les composants chimiques, l'activité

antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles d'*Origanum majorana* et de *Mentha spicata*. Ces plantes locales sont une source inestimable en divers composés doués d'activités biologiques, ce qui justifie leurs utilisations en médecine traditionnelle.

## Références bibliographiques

---

## Références bibliographiques

1. **Abadlia M., Chebbour, A.H, (2014).** Etude des huiles essentielles de la *Mentha piperita* et tester leurs effets sur un modèle biologique des infusoires. *Mémoire de Master, Université de Constantine1*, 90p.
2. **Abbes Amal. (2014).** EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES D'AMMOIDES VERTICILLATA « NOUKHA » DE LA REGION DE TLEMCCEN DU Diplôme de Master. Tlemcen : Univercité Abou Bekr Belkaid.
3. **Abdelli W., (2017).** Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea et de Thymus vulgaris*. Thèse de doctorat 3ième cycle LMD, Microbiologie Appliquée, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 1-2 ; 15-16 ; 31-35 ; 70-72 ; 80 ; 90 ; 104p.
4. **Abootalebian, M., Keramat, J., Kadivar, M., Ahmadi, F. and Abdinian, M. (2016).** Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different *Mentha spicata* and *M. longifolia* accessions. *Annals of Agricultural Science*, 61: 175-179.
5. **AFNOR (Association Française de Normalisation) 2000.** Recueil des normes françaises “huiles essentielles”. Monographies relatives aux huiles essentielles. *AFNOR, Paris (AFNOR NF T 75-006)*. Association Française de normalisation Paris, pp 559-563.
6. **AFNOR., (1986).** Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles ; *AFNOR* ; Paris. 57p.
7. **AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Sante). (2008).** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles ; bd Anatole France - F-93285 Saint-Denis cedex ; 143/147.
8. **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.
9. **Akhtar N, Ihsan-ul-Haq, Bushra Mirza. (2015).** Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian Journal of Chemistry*.  
[www.sciencedirect.com/science/article/.../S187853521500032](http://www.sciencedirect.com/science/article/.../S187853521500032).
10. **Alakbarov, F. (2003).** Aromatic herbal baths of the ancients. *The Journal of the American Botanical Council*, 57, 40-49.

11. **Al-Howiriny T., (2009).** Protective Effect of *Origanum majorana* L. 'Marjoram' on various Models of Gastric Mucosal Injury in Rats. *Medical and life sciences*. Volume: 37, Issue: 3 pp. 531-545.
12. **Almeida, P.P., Mezzomo, N. and Ferreira, R.S. (2012).** Extraction of *Mentha spicata* L. Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition. *Food Bioprocess Technol*, 5: 548–559.
13. **Amara, N., Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kaibouche, N., Laissaoui, O., & Boufridi, A. (2017).** Applications potentielles de l'huile essentielle de lavande papillon (*Lavandula stoechas* L.) comme conservateur alimentaire naturel. *Phytothérapie*, 1-9.
14. **Anthoula, A. (2003).** La filière "Plante aromatique et médicinale. FAO Projet "Assistance au Recensement Agricole". Liban.
15. **Avlessi F., Alitonou G.A., Djenontin T S., Tchobo F., Yèhouéno B., Menut C., SohounhloùéD., (2012).** Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, 1(3): 7-13.
16. **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.
17. **Bajpai V.K., Kang S.C, 2010,** Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Mikiex. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 87, 327-336p
18. **Braga, P. C., Dal Sasso, M., Culici, M., Galastri, L., Marceca, M. T., & Guffanti, E. E. (2006).** Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology*, 76(2), 61-68.
19. **Baranauskiene R., Venskutonis P.R., Viskelis P., Dambrauskiene E, (2003).** Influence of nitrogenfertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *J. Agr. Food Chem*, 51(26), 7751-7758p
20. **Barba Orellana F J, Zhu Z, Koubaa M, Sant'Ana A S, Orlie V., (2016).** Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by- products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 49: 96-109.
21. **Bardaweel, S. K., Gul, M., Alzweiri, M., Ishaqat, A., ALSalamat, H. A., & Bashatwah, R. M. (2018).** Reactive oxygen species: The dual role in physiological and pathological conditions of the human body. *The Eurasian journal of medicine*, 50(3), 193.

22. **Bardeau F. (2009)** - les huiles essentielles : découvrir les bienfaits et les vertus. Ed. Lanore, Paris, 32- 198-201 P.
23. **Baser K H C, Demirci F., (2007).** Chemistry of essential oils, in Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability, edited by Berger RG, New York, Springer, Berlin, Germany, 43–86 p.
24. **Benayad N., (2008).** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63p.
25. **Benbouali M., (2006).** Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de "*Mentha rotundifolia et Thymus vulgaris*". Magister, Génie chimique, Université Hassiba BEN BOUALI –CHLEF, 6-10 ; 17 ; 20-24 ; 29-37 ; 68-73p.
26. **Bentchicou A., (1999).** Extraction, caractérisation et analyse de l'huile essentielle de *Thym d'Algérie* par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Thèse d'ingénieur, Univ.Médéa.
27. **Berger, M., and Que, Y. (2009).** "Traitement nutritionnel du grand brûlé." *Réanimation*, (Vol. 18(8)).
28. **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.
29. **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.
30. **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.
31. **Binov L., (2001.).** *Oxydants/antioxydants : un équilibre important.*
32. **Boucekrit, 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>.
33. **BOUCHOUKA.E. (2016).** *Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes.* ANNABA : UNIVERSITE BADJI MOKHTAR –.

34. **Boudjouref Mourad. (2011).** *Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'Artemisia campestris L du diplôme de Magister.* Sétif: Université Ferhat Abbas,.
35. **BOUHADDOUDA N.AOUADI S., LABIOD R. (2016).** *evaluation of chemical composition and biological activities of essential oil and methanolic extract of origanum vulgare l. ssp.glandulosum (desf.) from Algeria ., international journal of pharmacognosy and phytochemical research.*
36. **BOUHADDOUDA Nabila. (2016).** *Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : Origanum vulgare et Mentha pulegium ; du diplôme de Doctorat.* Annaba : Université d'Annaba.
37. **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.
38. **Boukhatem M N, Ferhat A, Kameli A., (2019).** Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles. Revue Agrobiologia, 9(2) : 1653-1659.
39. **Boukhebti H, Chaker A N, Belhadj H, Sahli F, Ramdhani M, Laouer H and Harzallah D.(2011).** Chemical composition and antibacterial activity of Mentha pulegium L. and Mentha spicata L. essential oils. Der Pharmacia Lettre. 3 (4) : 267-275. 3.
40. **Bouras Fatima Zohra et Houchi Abdelbasset. (2013).** Etude de l'activité antioxydante de la plante *Rumex Vesicarius L.*, Mémoire de Master. UNIVERSITE KASDI MARBAH. OUARGLA.
41. **Bouyahya, A., Chamkhi, I., Benali, T., Guaouguaou, F. E., Balahbib, A., El Omari, N., ... & El Menyiy, N. (2021).** Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of Origanum majorana L. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113318.
42. **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.
43. **Bouزيد J, (2018).** Evaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle d'une plante endémique *Hélichrysum italicum (Roth) G.DON.* *Thèse de Doctorat, Université de Sétif 1*, 130p
44. **Boyle W., (1995).** Spices and essential oils as perspectives. American Perfumer Essential Oil Review, **66**: 25-28.

45. **Brahmi F, Adjaoud A, Marongiu B, Falconieri D, Yalaoui-Guellal D, Madani K and Chibane M. (2016).** Chemical and biological profiles of essential oils from *Mentha spicata* L. leaf from Bejaia in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. 28 (3): 211–220.
46. **Brahmi, F. (2016).** Etude phytochimique et activités biologiques de quelque espèces du genre mentha : cas de *M.spicata* L., *M.puleguim* L. et *M.rotundifolia* L. huds. Thèse doctorat, Université Abderrahmane Mira Bejaia, p31-32.
47. **Brahmi, F., Adjaoud, A., Marongiu, B., Procedda, S., Piras, A., Falconieri, D.Yalaouini-Guellal, D., Elsebai, M. F., Madani, K. and Chiban, M. (2016).** Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*.10.
48. **Brahmi, F., Madani, K., Dahmoune, F., Rahmani, T., Bousbaa, K., Oukmanou, S.Chibane, M. (2012).** Optimisation of Solvent Extraction of Antioxidants (Phenolic Compounds) From Algerian Mint (*Mentha spicata* L.). *Pharmacognosy Communications*, 2: 72-86.
49. **Bremns, L. (2011).** Plantes aromatiques et médicinales 700 espèce. A Dorling Kindersley Book. Paris : Larousse, 190 p.
50. **Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 1120p.
51. **Bruneton J., (2016).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 5ème Ed, Tec & Doc Lavoisier, Paris, 719-776p. **Asbahani A E, Miladi K, Badri W, Sala M, Aït Addi EH, Casabianca H, El Mousadik A,**
52. **Bruneton, J, (1993).** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2ème édition, Tec & Doc Lavoisier, Paris, 915p.
53. **Brunton.J, (1999).** Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales, Edition Tec &Doc, 3eme édition Lavoisier .paris, P309-353, P480, P484-497, P585.
54. **Burt S., (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. *International journal of food microbiology*, 94(3): 223-253.
55. **Caillet S., Lacroix M, (2007).** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. *L'INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA)*, 08p.
56. **Carillon A, (2009).** Place de la phytothérapie dans les systèmes de santé au XXIème siècle. In : Conférence SIPAM, Djerba, Tunisie, Mars 2009, 7p.

57. **Chauhan, R. S., Kaul, M. K., Shahi, A. K., Kumar, A., Ram, G., & Tawa, A. (2009).** Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM (J) 26] from North-West Himalayan region, India. *Industrial crops and products*, 29(2-3), 654-656.
58. **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.
59. **Cheurfa M., (2015).** *Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé.* Thèse de doctorat LMD, sciences alimentaires et nutrition, Université Hassiba BEN BOUALI – Chlef, 4-7 ; 12 ; 19 ; 27-41p.
60. **Chevalier, A. (1938).** La Marjolaine vraie (*Majorana hortensis*) et sa culture. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 18(204), 593-604.
61. **Chibani S, (2013).** Etude phytochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algérien. *Thèse de Doctorat, Université Constantine 1*, 235p.
62. **Chishti, S., Kaloo, Z. A., & Sultan, P. (2013).** Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. *J. Pharmacogn. Phytother*, 5(10), 170-177.
63. **Chouitah O, (2012).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. *Thèse de Doctorat, Université d'Oran*, 143p.
64. **Curado M.A. et al., (2006).** Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytotherapy*, **67**, 2363-2369.
65. **Da Silva F., (2010).** *Utilisation des huiles essentielles en infectiologie orl.* Thèse de Doctorat, Pharmacie, UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1, 6 ; 26 ; 29 ; 45p.
66. **Dacosta Y. (2003).** *Les phytonutriments bioactifs.* Yves Dacosta (Ed). **Paris.**
67. **Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G, 2000,** GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agr. Food Chem*, **48**(6), 2576-2581p
68. **Dans J. e. Cillard, (2006).** *Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations.* (pp. 13:24-29.).
69. **De Sousa D P., (2012).** Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects. Nova Science Publishers. 1ère Ed. 236p.
70. **Delattre J., Beaudoux J.L. & Bonnefont-Rousselot D., (2005.).** *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques.* Lavoisier, Paris.
71. **Delune A, (2012).** Aromathérapie : 99 recettes aux huiles essentielles. *Eslaria*, 90p.

72. **Deschepper R, (2017).** Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. *Thèse de Doctorat, Université de Merseille, France*, 172p.
73. **Deshmane, D. N., Gadgoli, C. H., & Halade, G. V. (2007).** Anticonvulsant effect of *Origanum majorana L.* Pharmacologyonline, 1, 64-78.
74. **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).
75. **Dorman H. J. D., Deans S. G., (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, **88**(2) : 308-16.
76. **Douay Sébastien, (2008).** L3SVB0T ,Faculté libre des sciences et technologies, Systématique des Angiospermes.
77. **Edris, A. E. (2007).** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(4), 308-323.
78. **El Abed D., Kambouche N., (2003).** *Les huiles essentielles* ; Ed. Dar El Gharb ; Oran.
79. **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.
80. **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.
81. **El Idrissi, M., & Amechrouq, A. (2014).** Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum 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.
82. **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.

83. **Favier A., (2003).** Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Actualité chimique.
84. **Ferhat. M, (2016).** Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques des espèces : *mentha aquatica, stachys guyoniana et thymus dreatensis* (lamiaceae). UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI-CONSTANTINE.
85. **Fernandez X, Chemat F., (2012).** La chimie des huiles essentielles. Ed Vuibert, 288p.
86. **Figueredo G, (2007).** Etude chimique et statistique de la composition des huiles essentielles d'origans (*Lamiaceae*) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. *Thèse de Doctorat, Université de Clermont-Ferrand II, France*, 417p.
87. **Fleurentin Jaques, (2007).** Les plantes qui nous soignent, tradition et thérapeutique, Tome l'édition ouest .France, 163.
88. **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.
89. **Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswari, M., & Yogalakshmi, K. (2012).** Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitology research*, 110(5), 2023-2032.
90. **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.
91. **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.
92. **Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2016).** Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and antiacetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana L.* essential oil. *Microbial Pathogenesis*, 95, 86-94.
93. **Hameurlaine S., (2009).** *Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes Pituranthos scoparius et Rhantherium adpressum de la région de Ghardaia.* Magister ; Univ. Kasdi Merbah-Ouargla.

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.
95. **Hartmann D, Jilale A, Renaud FNR, Elaissari A., (2015).** Essential oils: from extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2): 220-243.
96. **Hussain A I, Anwar F and Shahid M. (2010).** Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan. *Journal of Essential Oil Research*. 22 (1): 78-84.
97. **Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani AH.(2010)** Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, p1827-1836 .
98. **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).
99. **Iserin, P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2nd edition, Dorling Kindersiey Limited, Londres. Page 241.
100. **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.
101. **Kalemba, D., Kunicka, A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem* 10, 813-829.
102. **Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes M.F., (2008).** Etude de sixhuiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne – Phytothérapie, 6 : 160–164.
103. **Karousou R., Koureas D.N. & Kokkini S., (2005).** Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Photochemistry*, 66, 2668-2673.
104. **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.
105. **Koubaa M, Mhemdi H, Barba F J, Roohinejad S, Greiner R, Vorobiev E., (2016).** Oil seed treatment by ultrasounds and microwaves to improve oil yield and quality: An overview. *Food Research International*, 85: 59-66.

- 106. Labiod, 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.
- 107. Laggoune S., Ozturk M., Erol E., Duru M.E., Abaza I., Kabouche A., Kabouche Z, (2016).** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oil of *Mentha spicata* from Algeria. *J M E S*,7(11), 4205-4213p
- 108. Laggoune, S., Öztürk, M., Erol, E., Duru, M. E., Abaza, I., Kabouche, A. and Kabouche, Z. (2016).** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of *Mentha spicata* L. from Algeria. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7 (11): 4205-4213.
- 109. 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
- 110. Lakhdar L., (2015).** *Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur Aggregatibacter Actinomycetemcomitans : Etude in vitro.* Thèse de doctorat, Sciences Odontologiques, Université Mohammed V de Rabat, 6 ; 38-45p.
- 111. Landsdown, R.V. (2014).** *Mentha spicata*. The IUCN Red List of Threatened species. "www.iucnredlist.org".
- 112. LANSEUR.R, (2017).** *Evaluation in-vitro des activités anti-oxydante et anti-inflammatoire des huiles essentielles d'Origanum glandulosum et Rosmarinus officinalis seules et en combinaison.* Université Abderrahmane Mira de Bejaia.
- 113. Laurent J, (2017).** Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en Officine. *Thèse de Doctorat, Université de Toulouse III, France*, 225p.
- 114. Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P. & Prost M., (2001).** *Stress oxydant et pathologies humaines. Presse med.* (Vol. 30(21)).
- 115. Li Y, Fabiano-Tixier A S, Chemat F., (2014).** *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry.* 1ère Ed, Springer Cham Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 71p.
- 116. Loizzo, M .R, (2009).** «Chimical analysis, antioxydant, anti inflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum chrebergii* Boiss and *Origanum syriacum* L.essential oil», *food chemistry* , ,117,p174-180.
- 117. Loziene K. & Venskutonis P.R., (2005).** Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **33**, 517-525.

118. **Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., & Li, C. (2011).** In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9), 3057-3064.
119. **Mahboubi, M., & Haghi, G. (2008).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of ethnopharmacology*, 119(2), 325-327.
120. **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
121. **Malik F., Hussain S., Sadiq A., Parveen G., Wajid A., Shafat S. (2012).** Phytochemical analysis, anti-allergic and anti-inflammatory activity of *mentha arvensis* in animals. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 6: 613-619.
122. **Malik F., S. Hussain, A. Sadiq, G. Parveen, A. Wajid, S. Shafat, R. A. Channa, R.Mahmood, H. Riaz, M. Ismail & F. Yasin Raja. (2012).** Phyto-chemical analysis, anti-allergic and anti-inflammatory activity of *Mentha arvensis* in animals. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*;6(9):613-619. [www.academicjournals.org/journal/AJPP/article.../C347DAC33059](http://www.academicjournals.org/journal/AJPP/article.../C347DAC33059)
123. **Malti C E W., (2019).** Etude des activités biologiques et de la composition chimique des huiles essentielles de trois plantes aromatiques d'Algérie : *Pituranthos scoparius* (Guezzah), *Santolina africana* (EL Djouada) et *Cymbopogon schoenanthus* (El Lemad). These de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, 34p.
124. **MANALLAH Ahlem. (2012).** *Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive Olea europaea L* Diplôme de Magister. Sétif: Université Ferhat Abbas.
125. **Mebarki N., (2010).** *Extraction de l'huile essentielle de Thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse – antimicrobienne.* Magister, Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques, Université M'hamed Bougara Boumerdes, 1 ; 14 ; 29-31 ; 51 ; 107p.
126. **Medjekane M., (2017).** *Prévalence de l'infection à Helicobacter pylori et son inhibition par des molécules bioactives.* Thèse de Doctorat, Nutrition humaine, Université Hassiba Benbouali de Chlef.
127. **Melet I., Benchabane N., (1997).** *Contribution à l'extraction et l'étude de l'huile essentielle d'eucalyptus.* Thèse d'ingénieur d'état ; Univ. Médéa.

- 128. 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, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse. France, 157p.*
- 129. Moja S., Jullien F, (2014).** Les menthes, diversité des espèces et composition chimique. *Jardins de France, 630, 27-29p.*
- 130. Moon, H.K., Hong, S.P., Smets, E. and Huysmans, S. (2009).** Micromorphology and character Evolution of Nutlets in Tribe Mentheae (Nepetoideae, Lamiaceae). *Systematic Botany, 34(4): 760-776.*
- 131. Moosavy, M. H., & Shavisi, N. (2013).** Determination of antimicrobial effects of nisin and *Mentha spicata* essential oil against *Escherichia coli* O157: H7 under various conditions (pH, temperature and NaCl concentration). *Pharmaceutical sciences, 19(2), 61-67.*
- 132. 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.*
- 133. 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.*
- 134. Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F., & Capanoglu, E. (2020).** Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review. *Molecules, 25(20), 4711.*
- 135. Nanekarani, S., Goodarzi, M. and Heidari, M. (2012).** The Effect of Different Levels of Spearmint (*Mentha Spicata*) Extract on Immune System and Blood Parameters of Broiler Chickens. *APCBEE Procedia, 4: 135 – 139.*
- 136. 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.*
- 137. Ouis N, (2015).** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. *Thèse de doctorat, Université d'Oran 1, 224p*
- 138. Ouis N., (2015),** *Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil.* Thèse de Doctorat, Chimie Organique, Université d'Oran 1, 17p.

- 139. Oussou KR, Youlou S, Kanko C, Guessennd KN, Boti JB, Ahibo C, Casanova J., (2008).** Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Reaserch*, 1: 94-103.
- 140. 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.
- 141. 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.
- 142. Pharmacopée Européenne (2001).** 4<sup>ème</sup> édition; P22- 43.
- 143. Pibiri, M.C., (2005).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de doctorat. Ecole polytechniques Fédérale de Lausanne. 177p.
- 144. Poirot T, (2016).** Bon usage des huiles essentielles, effets indésirables et toxicologie. *Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France, 97p.*
- 145. Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C., Roura S.I, 2003,** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technoogy*, 36(7), 679-684p.
- 146. Regnault-Roger C., Philogène B.J.R., Vincent C. (2008).** Biopesticides d'origine végétale. *Edition TEC & DOC, Lavoisier, Paris, 546p*
- 147. Reichl F.X., Benecke J., Benecke M., Eckert K.G., Erber B., Golly I.C., Kreppel H., Liebl B., Muckter H., Szinicz L. & Zilker T.,. (2004.).** *Guide pratique de toxicologie.* (Vol. 1<sup>ère</sup> éd). Bruxelles.: De Boeck Université.,
- 148. Roberfroid, M. (2002).** Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34, S105-S110.
- 149. Rojas J and Buitrago A. (2015).** Essential oils and their products as antimicrobial agents: Progress and prospects. *Therapeutic Medicinal Plants From Lab to Mark*: 253-278.
- 150. Rubiolo P, Sgorbini B, Liberto E, Cordero C, Bicchi C., (2010),** Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour and fragrance journal*, 25(5): 282–290.
- 151. Russo M., Galletti G.C., Bocchini P. & Carnacini A., (1998).** Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum*

- vulgare* ssp. *hirtum* (Link)): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3741-3746.
- 152. Saba I., Anwar F, (2018).** Effect of harvesting regions on physico-chemical and biological attributes of supercritical fluid-extracted spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(2), 400-419p
  - 153. Sakkas, H., & Papadopoulou, C. (2017).** Antimicrobial activity of *basil*, *oregano*, and *thyme* essential oils. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(3), 429-438.
  - 154. Sari, M. (2018).** Étude biologique et phytochimique de l'origan *Origanum vulgare* L. ssp *glandulosum* Desf. Letswaart) espèce endémique d'Algerie-Tunisie. Thèse de doctorat en sciences, université Ferhat Abbas, Setif.
  - 155. Scimeca D., Tétou M, (2005).** Votre santé par les huiles essentielles : le guide pratique pour prévenir et guérir tous les maux quotidiens. *Alpenéditions*, 96p.
  - 156. 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.
  - 157. 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*.
  - 158. 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.
  - 159. Senoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A. and Vincenzo Defeo. (2015).** *Mentha spicata* essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. Against planktonic and biofilm cultures of *vibrio* spp strains. *Molécules*, 20: 14402-14424.
  - 160. Shahbazi, Y. (2015).** Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. *Journal of pathogens*, 2015.
  - 161. Sipailiene A., Venskutonis P.R., Baranauskiene R., Sarkinas A., (2006).** Antimicrobial Activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*, **18**: 698-703.

- 162. Snuossi, M., Trabelsi, N., Ben Taleb, S., Dehmeni, A., Flamini, G., & De Feo, V. (2016).** Laurus nobilis, Zingiber officinale and Anethum graveolens essential oils: Composition, antioxidant and antibacterial activities against bacteria isolated from fish and shellfish. *Molecules*, 21(10), 1414.
- 163. Soliman, F. M., Yousif, M. F., Zaghloul, 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.
- 164. 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.
- 165. Souza, E.L., Guerr, N.B., Stamford, T.L.M. and Lima, E.O. (2006).** Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.* 87 (1), pp. 22-25.
- 166. Soysal, Y. (2005).** Mathematical Modeling and Evaluation of Microwave drying Kinetics of mint (*Mentha spicata* L.). *Journal of Applied Sciences*, 5(7): 1266-1274.
- 167. Sujana, P., Sridhar, T.M., Josthna, P., Naidu, C.V. (2013).** Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Mentha piperita* L. (Peppermint) – an important multipurpose medicinal plant. *Am. J. plant Sci.*; 4:77-83.  
[www.researchgate.net/.../318712690\\_Antibacterial\\_Activities](http://www.researchgate.net/.../318712690_Antibacterial_Activities)
- 168. Sulieman, S. (2011).** Does GABA increase the efficiency of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in legumes? *Plant signaling & behavior*, 6(1), 32-36.
- 169. Sylvain S., (2010).** - Étude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats. Thèse de doctorat, université de Corse Pascal Paoli.
- 170. 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.
- 171. Taofiq; O. M., (2016).** *Antiinflammator ypotential of mushroom extracts and isolated metabolites. Trend. Food* (pp. 50 : 193–210.).
- 172. Telci, I., Demirtas, I., Bayram, E., Arabaci, O., & Kacar, O. (2010).** Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*, 32(3), 588-592.

- 173. Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J, (2009).** Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food. Chem*, *57*(14), 5987-6000p.
- 174. Touhami A, (2017).** Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différents genres *Thymus* récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement. *Thèse de Doctorat, Université d'Annaba*, 173p.
- 175. Touré D., (2015).** *Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire.* Thèse de doctorat, Biochimie, Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY, 5-15 ; 41 ; 49 ; 81p.
- 176. 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.
- 177. Ultee A., Bennik M.H., Moezelaar R., (2002).**The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 1561-1568.
- 178. Van Damme P., (2001).** Pesticide, drug and essential oil crops. In: Raemakers R.H., ed. Crop production in tropical Africa. Brussels, Belgium : Directorate General for International Cooperation (DGIC), 1155-1166.
- 179. 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.
- 180. 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.
- 181. Wan J., Wilcock A., Coventry M.J., (1998).** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*.**84**: 152-158.
- 182. Wannissorn B., Jarikasem S., Siriwangachai T., Thubthimthed S., (2005).** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, **76**: 233-236.

- 183. Wollinger A. P., (2016).** *Antioxidant activity of hydro distillation water residues from Rosmarinus officinalis L. leaves determined by DPPH assays.* (pp. 19: 754–765.). Comptes Rendus Chim.
- 184. Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., ... & Li, H. B. (2017).** Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 96.
- 185. Yakhlef G., (2010).** Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris l. et Laurus nobilis l.* Magister, Biochimie Appliquée, UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR –BATNA, 10 ; 43-44p.
- 186. Zekri, N., Elazzouzi, H., Drioche, A., Satrallah, A., Belghiti, M. A. and Zair, T. (2016).** Effect of Geographic Locations on Chemical Composition of *M. Spicata L.* Essential oils from Moroccan Middle-Atlas. *Der Pharmacia Lettre*, 8 (4):146-150.
- 187. Zhiri A., (2006).** Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News Science, Nutrition, Prévention et santé. Edité par la Fondation pour le libre choix*, 12 : 8.

# *Annexes*

## **Annexe 1**

### **1. Matériel non biologique**

#### **- Appareillage, verreries, réactifs et solution**

##### **Appareillage**

- Claevenger
- Bac benzène
- Balance de précision
- Etuve d'incubation
- Plaque chauffante
- Vortex
- Réfrigérant
- Hotte
- Agitateur
- Réfractomètre
- Chauffe ballon
- Agitateur
- Papier PH

##### **Verreries et autres**

- Béchers
- Ballon
- Fioles
- Biotes de pétrie
- Coton
- Disque en papier
- Ecouvillons
- Flacon en verre
- Gants
- Micropipette
- Papier aluminium
- Papier filtre
- Pince stérile
- Pipette pasteur
- Pipette gradué
- Seringues
- Tubes à essai
- Réfrigérant
- Portoir

##### **Réactifs et solution**

- L'eau distillée
- L'eau physiologique
- DPPH
- Ethanol
- Méthanol
- Acétate de plomb
- Iode (I<sub>2</sub>)
  
- Acétate de sodium.
- Réactif de Wagner.
- Hydroxyde de sodium (KOH).
- Phénolphtaléine.
- FeCl<sub>3</sub>
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Hydroxyde de potassium
- Acide chlorhydrique

# Annexes

## Annexe 2

### 1. Résultats du Screening phytochimique



**Figure 31** : Identification de quelques composés chimique (Original, 2022)

# *Annexes*

## Annexe 3

### Indices physico-chimiques



**Figure 32 : Réfractomètre  
(Original, 2022)**



**Figure 33 : pipier PH  
(Original, 2022)**

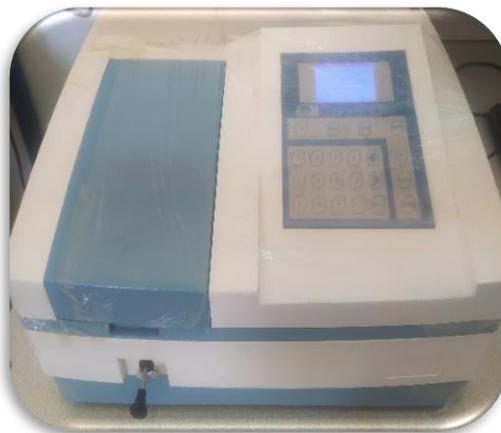
# *Annexes*

## Annexe 4

### Résultats de l'activité antioxydant



**Figure 34** : Résultats de l'activité antioxydante (Originale, 2022)



**Figure 35** : Spectromètre (Originale, 2022)

# *Annexes*

## Annexe 5

### Etude de l'activité antimicrobienne



**Figure 36** : Etuve de pailleuse  
(Originale, 2022)



**Figure 37** : Four Pasteur  
(Originale, 2022)



**Figure 38** : Boîtes de pétrie  
(Originale, 20

# *Annexes*

## Annexe 6



**Figure 39 : Balance analytique  
(Originale, 2022)**



**Figure 40 : Plaque chauffante  
(Originale, 2022)**



**Figure 41 : Appareil de GPC/MS**