



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abbes LAGHROUR - Khenchela  
Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie  
Département De Biologie Moléculaire Et Cellulaire

**Mémoire**

*En vue de l'obtention du diplôme de Master académique en **Biologie***  
**FILIERE : Sciences Biologiques**  
**OPTION : Microbiologie Appliquée**

**Thème**

**Investigation des propriétés antimicrobiennes de l'huile  
essentielle d'une plante médicinale de la pharmacopée  
traditionnelle**  
***Origanum majorana L.***

**Présenté par**

BOUCHAREB Rofaida Ikram  
BELAFDHEL Dounia

**Membres du jury**

<b>Président :</b> Dr. LARBA Rabah	(M.C.A)	Université Abbes Laghrou – Khenchela-
<b>Encadrante :</b> Dr. DOUAOUYA Lilia	(M.C.A)	Université Abbes Laghrou-Khenchela-
<b>Examinateur :</b> Dr. Tabet Rachid	(M.C.B)	Université Abbes Laghrou-Khenchela-

**Année universitaire : 2023/2024**

# REMERCIEMENTS

*Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage, et la patience pour terminer ce travail.*

*Au terme de ce travail, nous voudrions exprimer notre profonde gratitude et notre respect à notre superviseur, **Dr. DOUAOUYA Lilia**, qui n'a eu de cesse de nous nourrir et de nous guider tout au long de cette formation et de ce travail. Le partage de ses connaissances, de son expertise, et de ses conseils a été crucial pour l'achèvement de ce mémoire. Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à **Dr. LARBA Rabah**, qui a, avec beaucoup d'amabilité, accepté de présider le jury. Nous tenons à lui exprimer notre respectueuse gratitude.*

*Nous remercions **Dr. TABET Rachid** pour avoir accepté d'examiner de près notre travail. Nous remercions amplement **Dr. Boutarfi Zakaria**, qui, malgré sa lourde charge de travail, n'a cessé de nous encourager et de nous guider par ses conseils et son aide tout au long de la réalisation de la partie pratique. Sans lui, nous n'aurions pas pu améliorer ce travail. Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude aux enseignants du Master académique « **Microbiologie appliquée** » durant ces deux années.*

*Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements à l'ensemble du personnel des laboratoires pédagogiques, en particulier la directrice du complexe **MME. Chorfi Rafika**.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à **MME. MIZANE SARA**, qui nous a aidés humblement et n'a pas lésiné sur son aide.*

*Nous remercions sincèrement à **MME. Bahia** pour toute l'aide qu'elle nous a apportée dans la réalisation de ce travail.*

# DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail :

- *A l'homme de courage et de force ; à celui qui a toujours été présent, qui m'a appris les vraies valeurs de la vie à celui qui m'a soutenu en toutes circonstances ; mon père **Boufenouar** que j'aime .*
- *A la femme la plus courageuse, sensible, généreuse , à celle qui a su me donner amour et joie de vivre , à celle qui a toujours montrée affection et compréhension à mon égard , ma mère **bouchareb Souaad** que j'aime.*
- *A mes chères frères Mohammed et Oussama et sœurs Djihane , Abir , Malak , Aridje qui m'ont fourni du courage, du soutien , et tout leur effort et moyen pour que je termine mes études.*
- *A mon grand-père et ma grand-mère Saadi et Dalia.*
- *Aux enfants Sanad , Maria .*
- *A toute ma famille Bouchareb et surtout mes tantes et mes oncles*  
*Mes tantes Assia , Walida , Bessma , youssra .*  
*Mes oncles Ramzi , Hani , Karim .*
- *A ma chérie Zebair Selma .*
- *A mes collègues Selma , Chaïma , Noura , Aya , Faten , Rahma*
- *A mes amis les plus fidèles Dounia Belafdhel , Bessma Hout*

Rofaida

# DÉDICACES

*Je dédie cet humble travail à mes chers parents, la source de ma joie et le secret de ma force. Ils seront toujours mes modèles et le bonheur de ma vie.*

*À mon père, Belfadhel Mohammed Al-Eid, qui m'a enseigné le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice, ses conseils et ses encouragements.*

*À ma chère mère, Hoggasse Nadjma, merci pour tes sacrifices et ton soutien. C'est à toi que je dois ma réussite.*

*À mes chers frères et sœurs, Souhila et son mari, Roumaïssa, Zaineb, Walid, Soufian, Farid et Abde rahim, pour leur affection constante.*

- *À l'ange de la famille : Assile.*
- *À ma chère sœur et amie, Bouchareb Dounia.*
- *À mon binôme et chère sœur Rofaïda Ikram.*  
*À mes chères amies Amel, Salma, Aya, Bassema, Noura, Faten, chaïma, Malak et Roumaïssa.*
- *À tous les membres de ma famille Bellafdhel.*

*À tous les membres de ma famille, à mes amis et à mes camarades de promotion. À toutes les personnes qui me connaissent de près ou de loin.*

**Dounia**

**Investigation des propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle d'une plante  
médicinale de la pharmacopée traditionnelle  
*Origanum majorana* L.**

**Résumé**

L'objectif de cette étude est d'analyser l'effet antimicrobien de l'huile essentielle d'une plante aromatique et médicinale de la flore algérienne, appelée *Origanum majorana* L., sur 4 souches bactériennes de référence, 18 souches d'origine hospitalière et 2 champignons.

L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de la marjolaine sèche par hydrodistillation a donné un rendement très faible, de 0,10 %. Quant à l'efficacité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disque, toutes les souches de référence testées ont démontré une sensibilité à l'HE, avec une activité inhibitrice extrême sur *Staphylococcus aureus* traduite par un diamètre de zone d'inhibition de 26 mm.

L'huile essentielle a présenté des propriétés antibactériennes variées sur les 18 souches cliniques Gram négatif testées, dont 37 % sont multirésistantes, avec une activité inhibitrice élevée sur *Escherichia coli* et *Proteus spp.* Néanmoins, *E coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp* ont témoigné d'une grande sensibilité à l'aromatogramme. En utilisant la méthode de dilution en milieu liquide et celle en milieu solide, les CMI ont oscillé entre 16 et 50 mg/ml et entre 20 et 100 mg/ml respectivement. Les résultats de la détermination de la CMB ont démontré que l'huile essentielle étudiée possède une action bactéricide contre 99 % des souches testées. De son côté, l'analyse qualitative de l'activité antifongique révèle que l'huile essentielle possède une activité antifongique significative contre les champignons *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

En conclusion, l'huile essentielle issue d'*Origanum majorana* L. possède une activité bactéricide et antifongique exceptionnelle. Ainsi, il peut être une ressource naturelle et une excellente alternative aux antibiotiques pour lutter contre les infections bactériennes et fongiques.

**Mots clés :** *Origanum majorana* L, Huile essentielle, Activité antibactérienne, Activité antifongique, Bactéricide.



# Investigating the antimicrobial properties of an essential oil derived from a medicinal plant listed in the traditional pharmacopoeia (*Origanum majorana* L.)

## Abstract

The aim of this study was to analyze the antimicrobial effect of the essential oil of an aromatic and medicinal plant from the Algerian flora, *Origanum majorana* L., on 4 reference bacterial strains, 18 strains of hospital origin, and 2 fungi. Extraction of the essential oil from the aerial part of dry marjoram by hydrodistillation gave a very low yield of 0.10%. As for antibacterial efficacy using the disk diffusion method, all the reference strains tested showed sensitivity to the EO, with extreme inhibitory activity on *Staphylococcus aureus*, reflected by an inhibition zone diameter of 26 mm. The essential oil showed varied antibacterial properties on the 18 Gram-negative clinical strains tested, 37% of which were multi-drug resistant, with high inhibitory activity on *Escherichia coli* and *Proteus spp.* However, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter spp.* showed high sensitivity to the aromagram. Using the liquid dilution method and the solid dilution method, MICs ranged from 16 to 50 mg/ml and from 20 to 100 mg/ml, respectively. The results of the BMC determination showed that the essential oil studied has bactericidal action against 99% of the strains tested. Qualitative analysis of antifungal activity revealed that the essential oil had significant antifungal activity against the fungi *Aspergillus niger* and *Candida albicans*. In conclusion, the essential oil derived from *Origanum majorana* L. possesses exceptional bactericidal and antifungal activity. As such, it can be a natural resource and an excellent alternative to antibiotics for combating bacterial and fungal infections.

**Key words:** *Origanum majorana* L., essential oil, antibacterial activity, antifungal activity, bactericide.

## تقصي الخصائص المضادة للميكروبات للزيت العطري لنبات طبي من دليل الأدوية التقليدية البردقوش (*Origanum Majorana*).

### ملخص

كان الهدف من هذه الدراسة هو تحليل التأثير المضاد للميكروبات للزيت العطري وطبي من النباتات العطرية والطبية من النباتات الجزائرية: البردقوش (*Origanum Majorana* 1)، على 4 سلالات بكتيرية مرجعية و18 سلالة من أصل مستشفى و2 من الفطريات.

وقد أعطى استخلاص الزيت العطري من الجزء الهوائي من البردقوش الجاف عن طريق التقطير المائي محصولاً منخفضاً جداً بنسبة 0.10%، في حين أظهرت الفعالية المضادة للبكتيريا باستخدام طريقة الانتشار القرصي أن جميع السلالات المرجعية التي تم اختبارها كانت حساسة للزيت العطري مع نشاط مثبط شديد ضد *Staphylococcus aureus* التي يبلغ قطر منطقة تثبيطها 26 ملم.

كما أظهرت أيضاً أن للزيت العطري خصائص مضادة للبكتيريا متنوعة على الثمانية عشر سلالة سريرية سالبة الجرام التي تم اختبارها، حيث أن 37% منها كانت متعددة المقاومة للمضادات الحيوية مع نشاط مثبط عالي ضد *Escherichia coli* و *Proteus spp*، و حساسية عالية ضد

### *Pseudomonas aeruginos* و *Enterobacter spp* و *Klebsiella pneumonia*

وفقاً لقيم الحد الأدنى من التركيز المثبط (CMI) في وسط سائل، والحد الأدنى من التركيز القاتل (CMB) في الوسط الصلب تبين لنا أن الزيت العطري له تأثير قاتل ضد 99% من السلالات التي تم دراستها، كما أن قيم الحد الأدنى من التركيز المثبط تتراوح بين 16 إلى 50 مجم/مل ومن 50 إلى 100 مجم/مل على التوالي.

من جانب آخر يكشف تقييم النشاط المضاد للفطريات بتقنية الانتشار عن طريق القرص ان للزيت العطري تأثيراً كبيراً ضد كل من *Candida albicans* و *niger Aspergillus*.

في الختام، يمكننا القول إن الزيت العطري المستخلص من البردقوش (*Origanum majorana L*). له نشاط مضاد فعال ضد كل من البكتيريا والفطريات الأمر الذي يمكننا من اعتبار الزيت العطري للبردقوش (*Origanum majorana L*) مورداً طبيعياً وبديلاً ممتازاً للمضادات الحيوية لمكافحة الالتهابات البكتيرية والفطرية.

الكلمات المفتاحية: *Origanum majorana L*، زيت عطري، نشاط مضاد للبكتيريا، نشاط مضاد للفطريات.

# Table des matières

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. La phytothérapie .....	3
1.1. Différents types de la phytothérapie .....	3
2. Plante médicinale .....	3
2.1. Définition .....	3
2.2. Composition chimique des plantes médicinales .....	3
3. Généralités sur la plante étudiée .....	4
3.1. Présentation de la famille des Lamiacées .....	4
3.2. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Origanum</i> .....	4
3.2.1. Présentation de genre <i>Origanum</i> .....	4
3.2.2. Classification de genre <i>Origanum</i> .....	4
4. L'espèce <i>Origanum majorana</i> L. ....	5
4.1. Historique d' <i>Origanum majorana</i> .....	5
4.2. Noms vernaculaires .....	5
4.3. Description morphologique .....	5
4.4. Composition chimique .....	6
4.5. Propriétés pharmacologiques .....	6
5. Etude chimique antérieure sur les métabolites secondaires de l'espèce <i>Origanum majorana</i> ..	.....7
5.1. Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Origanum majorana</i> L .....	7
6. Activité antimicrobienne .....	9
6.1. Activité antibactérienne .....	9
6.2. Activité antifongique .....	10

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

1. Matériel .....	12
1.1. Matériel biologique .....	12
1.1.1. Matériel végétal .....	12
1.1.2. Souches bactériennes et fongiques .....	12
1.2. Réactifs chimiques et instrumentations .....	13
3. Méthodes.....	13
1. Extraction par hydrodistillation. ....	13
2. Étude <i>in vitro</i> des activités biologiques de l'HE.....	14
1. Étude <i>de</i> l'activité antibactérienne .....	14
1.1. Méthode des disques -Test d'efficacité.....	14
1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	18
1.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) .....	19
2. Etude de l'activité antifongique .....	19
3. Caractérisation de l'activité antimicrobienne .....	20

## **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

1. Rendement .....	23
2. L'activité antimicrobienne .....	35
2.1. Résultats de l'activité antibactérienne .....	
2.2. Résultats de l'activité antifongique .....	35
3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)et bactéricide (CMB) .....	36
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>57</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>58</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>70</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Composition chimique de la poudre de marjolaine (100g) .....	6
<b>Tableau 2</b> : Composants majoritaires (% > 4.0) d'huile essentielle de l'espèce <i>Origanum majorana</i> .....	8
<b>Tableau 3</b> : Souches bactériennes de référence utilisées pour le test de sensibilité .....	12
<b>Tableau 4</b> : Souches bactériennes cliniques utilisées pour les tests de sensibilités .....	12
<b>Tableau 5</b> : Souches fongiques utilisées pour le test de sensibilité .....	13
<b>Tableau 6</b> : Rendement de l'extraction de l'huile essentielle <i>Origanum majorana</i> L. ....	24
<b>Tableau 7</b> : Diamètres des zones d'inhibition induites par l'HE d'O <i>majorana</i> L. ....	22
<b>Tableau 8</b> : Diamètres des zones d'inhibition induites par l'HE d'O <i>majorana</i> L. ....	25
<b>Tableau 9</b> : Résultats de CMI et CMB des souches bactériennes de référence testées. ....	28
<b>Tableau 10</b> : Résultats de CMI et CMB des souches bactériennes cliniques testées... ..	31
<b>Tableau 11</b> : Diamètres des zones d'inhibition de l'HE vis-à-vis les souches fongiques testées.....	35

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Différentes parties aériennes d' <i>Origanum majorana</i> .....	6
<b>Figure 2</b> : Procédé d'extraction de L'huile essentielle par hydro distillation.....	14
<b>Figure 3</b> : Repiquage des espèces bactériennes. ....	15
<b>Figure 4</b> : Préparation de l'inoculum. ....	16
<b>Figure 5</b> : Ensemencement des souches bactériennes sur milieu gélosé (MH). ....	16
<b>Figure 6</b> : Préparation des disques d'aromatogrammes en présence d'HE. ....	17
<b>Figure 7</b> : Instrument de mesure des diamètres des zones d'inhibition en mm. ....	18
<b>Figure 8</b> : Etapes de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	19
<b>Figure 9</b> : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne des souches de référence testées. ....	24
<b>Figure 10</b> : zones d'inhibition de l'huile essentielle d' <i>Origanum majorana</i> L des souches de référence testées. ....	24
<b>Figure 11</b> : Antibiogramme des souches cliniques testées. ....	25
<b>Figure 12</b> : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne des souches cliniques testée.....	27
<b>Figure 13</b> : Zones d'inhibition induites par l'HE d' <i>O majorana</i> L....	27
<b>Figure 14</b> : La lecture de la CMI de l'HE contre les souches référentielles. ....	30
<b>Figure 15</b> : La lecture de la CMB de l'HE contre les souches référentielles.....	31
<b>Figure 16</b> : Histogramme des CMI et CMB des souches bactériennes de référence testées. .	31
<b>Figure17</b> : La lecture de la CMB des huiles essentielles contre les souches cliniques.....	34
<b>Figure 18</b> : Histogramme des CMI de l'HE contre les souches bactériennes cliniques testées.....	34
<b>Figure 19</b> : Histogramme des diamètres des ZI de la croissance des souches fongiques testées. ....	34
<b>Figure 20</b> : Zone d'inhibition induites par L'HE contre les souches fongiques testées. ....	34

## Liste des abréviations

- ATCC:** American Type Culture Collection.
- CA-SFM :** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- CC :** Colonne Chromatographique
- CFU :** Colony Forming Units.
- CHNYO :** Centre Hospitalier National Yalgado Ouédraogo
- CI<sub>50</sub> :** Concentration inhibitrice à 50%
- CMB :** Concentration minimale bactéricide
- CMB :** Concentration Minimale Bactéricide
- CMF :** Concentration Minimale Fongicide
- CMI :** Concentration Minimale Inhibitrice
- DMSO :** Di Méthyl Sulf Oxide
- EC :** *Escherichia coli*
- Entéro :** *Entérocooccus sp*
- EO:** Essential Oil
- GN:** Gélose Nutritive
- Gram - :** Gram négatif
- Gram + :** Gram positif
- HE :** Huile Essentielle
- KERN PCB:** Kern Precision Balances.
- Kp :** *Klebsiella pneumoniae*
- MH :** Muller-Hinton.
- PDA :** Potato Dextrosée Agar.
- R :** Résistant
- S:** Sensible.
- SP-UV:** Spectrophotomètre UV-Visible-.
- ZI :** Zone d'Inhibition.

A blue scroll graphic with a central text box. The scroll is outlined in blue and has two grey, semi-circular elements at the top-left and bottom-left corners, suggesting it is unrolled. In the center of the scroll is a white rounded rectangle with a blue border, containing the word "Introduction" in a bold, italicized black serif font.

***Introduction***

Depuis toujours, partout dans le monde, en particulier dans les pays méditerranéens, les plantes aromatiques médicinales (PAM) constituent une source inépuisable d'huiles essentielles. Ces dernières ont joué un rôle important dans la culture économique de nombreux peuples à travers les âges, que ce soit dans le domaine industriel ou médical (**Muthanna et al., 2021**).

Dernièrement, l'adoption de la médecine traditionnelle en tant qu'alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles ont incité des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales. En raison de la prise de conscience croissante des effets secondaires négatifs causés par les drogues modernes, de nombreux individus sont à la recherche de remèdes normaux, sans effets secondaires et bien sûr au coût élevé de la médecine conventionnelle. Les huiles essentielles suscitent aujourd'hui de plus en plus l'intérêt des chimistes, biologistes et médecins en raison de leur concentration en composés terpéniques actifs qui offrent une multitude d'applications thérapeutiques et industrielles aussi diverses que la chimie, l'agroalimentaire, la cosmétique et la pharmacie (**Bruenton, 2004**).

En Algérie et depuis longtemps nous avons recours à la médecine traditionnelle grâce à la richesse et la diversité floristique de notre pays, cette dernière constitue un véritable réservoir phytogénétique, avec environ 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques (**Aiche-Iratni, 2016**).

La famille des Labiées est connue par sa richesse en taxons producteurs des huiles essentielles, terpènes et composés phénoliques. Le genre *Origanum* (*Lamiaceae*) se transige de 43 espèces et 18 hybrides disposés en trois groupes et 10 sections. Parmi les espèces de ce genre, il existe quelques plantes considérées comme étant les plus aromatiques dans le monde végétal, citons par exemple la marjolaine (*O. majorana* L.) (**Muthanna et al., 2021**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, dont l'objectif essentiel consiste à évaluer *in vitro* l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites par hydrodistillation à partir de la partie aérienne sèche d'*Origanum majorane* L. Ce manuscrit s'articule autour de deux parties : Outre l'introduction et la conclusion générale, la première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle sont abordés des généralités sur la phytothérapie, la plante sélectionnée y compris l'importance des huiles essentielles et les activités biologiques étudiées. La deuxième partie est expérimentale divisée en deux chapitres ; le premier présente le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour l'extraction et l'étude *in vitro* du pouvoir antimicrobien des HE, le deuxième chapitre expose les résultats obtenus et la discussion.



**Chapitre I**

***Synthèse  
bibliographique***

## 1. La phytothérapie

Les origines du terme phytothérapie proviennent du grec « phytos » qui signifie plante et de « therapeuo » qui signifie traiter. D'après l'OMS, la phytothérapie désigne « la médecine fondée sur les médicaments à base de plantes, c'est-à-dire des médicaments dont les principes actifs sont uniquement composés de plantes ou d'extraits de plantes (Cazau *et al.*, 2013).

### 1.1. Différents types de la phytothérapie

- **Aromathérapie** : consiste à utiliser les essences des plantes, ou les huiles essentielles, qui sont des substances aromatiques produites par de nombreuses familles de plantes. Ces huiles sont souvent utilisées à travers la peau.
- **Gemmothérapie** : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les racines.
- **Herboristerie** : Cette méthode de phytothérapie est la plus traditionnelle et la plus ancienne. L'herboristerie utilise des plantes fraîches ou séchées, que ce soit au total ou en partie (écorce, fruits, fleurs).
- **Homéopathie** : utilise principalement les plantes, mais pas exclusivement ; les trois quarts des souches proviennent de plantes, tandis que le reste provient d'animaux et de minéraux (Ndife, 2019).

## 2. Plante médicinale

### 2.1. Définition

Les plantes médicinales peuvent être définies comme des plantes, ou parties de celle-ci, qui a des propriétés préventives et thérapeutiques pour les maladies humaines et animales, elles sont utilisées dans l'alimentation et les traitements (Oubibete, 2023), depuis au moins 7.000 ans avant notre ère par l'homme et sont à la base de la phytothérapie.

### 2.2. Composition chimique des plantes médicinales

Il existe différentes classes de métabolites secondaires dont 3 dominent la photochimie des plantes :

- ❖ **Les alcaloïdes** : comme la morphine, la caféine, la nicotine, la cocaïne, l'atropine
- ❖ **Les terpènes** : Il s'agit de la plus importante classe de métabolites secondaires, comprenant plus de 22 000 molécules. On y trouve des hormones végétales, des pigments, des stérols, des hétérosides et une grande quantité d'huiles essentielles importantes.
- ❖ **Les substances phénoliques** : comme les flavonoïdes, les tanins, la lignine, les coumarines et les huiles essentielles (Pererna et Vasudeva, 2015).

### 3. Généralités sur la plante étudiée

#### 3.1. Présentation de la famille des Lamiacées

La famille des lamiacées (*Lamiaceae*) ou labiées (*Labiatae*), est l'une des grandes familles et plus répandue dans le règne végétal comprend 6700 espèces regroupées dans environ 250 genres (Miller *et al.*, 2006). Entre autres les genres *Melissa* (mélisse), *Rosmarinus* (romarin), *Thymus* (thym), *Salvia* (sauge), *Lavandula* (lavande), et *Mentha* (menthe) (Kennedy, 2018). La famille des Labiées est connue par sa richesse en taxons producteurs des huiles essentielles, terpènes et composés phénoliques. Ils possèdent souvent des poils glanduleux et des glandes sous-épidermiques à huiles essentielles (Singh *et al.*, 2018)

#### 3.2. Aperçu bibliographique sur le genre *Origanum*

##### 3.2.1. Présentation de genre *Origanum*

Le terme « Origan » est apparu dans la langue au XIII<sup>e</sup> siècle. Oregano en Anglais, il dérive du latin *Origanum*, qui est lui-même issu du grec ancien origanon qui composé de deux mots : oros « montagne » et « ganos » : éclat Bouhadouda, (2016). Le genre Origan se compose de 43 espèces et 18 hybrides disposés en trois groupes et 10 sections, appartenant à la famille des Lamiacées, riche en substances bioactives qui peuvent être obtenu par extraction (HE et extrait par solvant organique) (Baytop, 1999). Cependant, la plupart des espèces, environ 75%, sont concentrées dans le pourtour méditerranéen, en particulier dans les régions de l'Est (Ietswaart., 1980).

##### 3.2.2. Classification de genre *Origanum* : (Skoula et Harborne, 2002)

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Spermatophytes</i>
Sous embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Origanum</i>

#### 4. L'espèce *Origanum majorana* L.

##### 4.1. Historique d'*Origanum majorana*

L'Origan des jardins ou marjolaine (*Origanum majorana*) est une plante annuelle aromatique de la famille des Lamiacées. Dans l'Antiquité, la marjolaine était utilisée comme épice par les anciens Grecs, car son parfum un peu fumé et sa saveur piquante la rendent délicieuse. Dans toutes les salades et tous les plats cuisinés. L'utilisation de la marjolaine est fréquente en Italie, en Espagne, à Chypre et en Turquie (Couplas, 2015).

La marjolaine est également connue pour ses vertus médicinales. La marjolaine était considérée par Dioscoride comme un remède contre les morsures ou les piqûres venimeuses. Il était considéré par Pline l'Ancien comme efficace pour éloigner les serpents et neutraliser les effets de l'opium. Selon Albert le Grand, la marjolaine est considérée comme une substance fortifiante et résolutive, et elle est utile contre toutes les affections de la poitrine qui provoquent de l'atonie. (Rokosuieva, 2015).

##### 4.2. Noms vernaculaires

Le terme « marjolaine » est apparu dans la langue en 1398. Il dériverait de l'ancien nom latin de la plante, amaracum, lui-même emprunté du grec “amarakos” un symbole d'amour, d'honneur et de bonheur (Sahraoui et al., 2016). La marjolaine reconnue par les noms suivants (Azzi, 2013) :

- **Nom français :** *Marjolaine*.
- **Noms anglais:** *Marjoram*, *Sweet marjoram*.
- **Nom vernaculaire :** Bardakouche.
- **Nom scientifique :** *Origanum majorana* L.

##### 4.3. Description morphologique

La marjolaine est une herbe vivace à tiges dressées, ramifiées, de 20 à 30 cm de haut. Elle présente des feuilles opposées, petites, ovales et cotonneuses, de 0,9 cm de large. Les fleurs, très ramifiées, se trouvent au sommet des tiges, se développant en grappes denses. Les feuilles sont pédonculées à l'aisselle. Pendant la floraison, de petites fleurs blanches ou un peu rosées émergent. Elle se caractérise par un calice double avec une lèvre supérieure orbiculaire.

La plante *Origanum majorana* se caractérise par sa lèvre inférieure bidentée et sa composition en 4 étamines divergentes et les fruits contiennent des tétrakènes (Fig1) (Beloued, 1998).



**Figure 1** : Différentes parties aériennes d'*Origanum majorana* L (Prerna et al.,2015).

#### 4.4.Composition chimique

En raison de son importance biologique et de sa variété de composition chimique, *Origanum majorana* est considéré comme l'une des plantes les plus couramment utilisées à travers le monde. (Tab1) résume les différents constituants de la poudre :

**Tableau 1**: Composition chimique de la poudre de marjolaine (100g) (Hafez, 2012).

Constituants	Teneur %
Glucides	72,18
Fibres brutes	19,52
Protéines	12,80
Graisses	3,75
Humidité	5,66
Cendres	5,62

#### 4.5.Propriétés pharmacologiques

La feuille fraîche ou séchée de cette herbe est utilisée, seule ou en association avec d'autres herbes, pour aromatiser de nombreuses préparations culinaires (soupes, notamment avec les viandes et les poissons grillés). La plante aromatique de la marjolaine est largement employée dans la cuisine, en particulier dans les plats méditerranéens. Son huile essentielle est réputée pour ses propriétés antiseptiques (Furia, 1973). On considère l'huile essentielle de

l'espèce *Origanum majorana* comme un puissant antispasmodique stomachique, qui apaise les spasmes, en particulier ceux de l'estomac et du colon. Son effet laxatif et digestif favorise le bien-être digestif et intestinal (Williams,1997). Elle a également des conséquences significatives sur le système psycho-sensoriel. On l'emploie afin de diminuer le rôle du système sympathique et de l'améliore (Burt, 2004).

### 5. Etude chimique antérieure sur les métabolites secondaires de l'espèce *Origanum majorana*

Des recherches sur les extraits de la partie aérienne de l'espèce *Origanum majorana* ont révélé la présence d'acides phénoliques tels que l'acide caféique, l'acide gallique, l'acide cinnamique, l'acide carsonique, l'acide rosmarinique, ainsi que des flavonoïdes tels que l'apigénine, la lutéoline, la quercétine, la catéchine et leurs glycosides telques l'isovetexine et la rutine.Par ailleurs, la marjolaine contient des flavonoïdes glycosides tels que la lutéoline-7-diglucoside, l'apigénine-7-glucoside, la diosmétine-7-glucuronide, le 6-hydroxylutéoline, le 6-hydroxyapigénine, l'arbutine et le méthylarbutine (Shan *et al* ., 2005).

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

L'*O. majorana* se distingue par ses saveurs et ses odeurs intenses, agréables et épicées. Plus précisément, cette plante renferme jusqu'à 3% d'huile volatile et comme composants principaux, en raison de son caractère aromatique (hydrate de sabinène, carvacrol, linalol). Les acides caféique et rosmarinique, les flavonoïdes, ainsi que les composés triterpéniques tels que l'acide oléanolique et l'acide ursolique, sont des stéroïdes (comme le  $\beta$ sitostérol), des terpénoïdes phénoliques, des glycosides phénoliques, des tanins et des sitostérols. Il y a également du sabinol, de l' $\alpha$ -terpinène, du terpinène-4-ol, du thujanol, du camphre, du pinène et de l'œugenol. (Vasudeva et Goel., 2015).

En raison des variations dans les localisations des échantillons, il est possible que la composition de l'huile essentielle diffère (Tab2). Selon les recherches, les composants phytochimiques de l'huile essentielle d'*Origanum majorana* sont le terpinène-4-ol et le cissabinène, qui contribuent à leur saveur et à leur arôme distinctif. Les substances chimiques. Les terpinolènes ( $\alpha$ -terpinolène et  $\gamma$ -terpinolène), le thymol et le carvacrol sont les plus courants. L'apigénine, le rosmarinate de méthyle et la lutéoline sont d'autres métabolites secondaires-7-Orutinoze (Deuschle *et al.*, 2018).

**Tableau 2 :** Composants majoritaires (% > 4.0) d'huile essentielle de l'espèce *Origanum majorana*.

Localité de l'espèce	Composé	Pourcentage %
<b>Canada</b> (Başer, 2016).	terpinène-4-ol	38.33
	$\alpha$ -terpinène	18
	$\gamma$ -terpinène	12.51
	cis-terpinéol	11
	Acétate de Myrcényl	4.54
<b>France</b> (Başer, 2016).	terpinène-4-ol	47.1
	cis-hydrate de sabinène	14.9
	p-cymène	14.3
	sabinène	4.9
	$\alpha$ -terpinéol	4.6
<b>Liban</b> (Hilan <i>et al.</i> , 2006)	$\alpha$ -Cariophyllène	30.0
	p-cymène	14.0
	$\gamma$ -terpinène	9.0
	Sabinène	6.70
	Linalol	5.60
	$\alpha$ -terpinéol	4.20
<b>Maroc</b> (El-Khal <i>et al.</i> , 2014).	4-terpinène	28.96
	$\gamma$ -terpinène	18.57
	$\alpha$ -terpinène	12.72
	Sabinène	8.02
	Acetate de linalyle	5.63
	Terpinolène	4.06

## 6. Activité antimicrobienne

Les antibiotiques sont des produits qui, à une dose limitée, peuvent anéantir les bactéries ou leur empêcher de se développer sans causer de dommages aux cellules eucaryotes. Ils sont très différents dans leur champ d'action. Les médicaments sont classés en fonction des micro-organismes pathogènes qu'ils inhibent : antibactérien, antifongique, antiviral. Selon **Prescott et al., (2018)**, le contact d'un agent antimicrobien avec un microbe entraîne deux réactions :

- Un effet mortel ou une action bactéricide, fongicide et viricide.
- Un effet bactériostatique : entrave la prolifération des bactéries.

Plusieurs recherches expérimentales laissent entendre que les composés phytochimiques, en particulier les composés oxygénés de la marjolaine, sont responsables de diverses activités biologiques (**Ben Salha et al., 2017**). La marjolaine a démontré une activité antibactérienne puissante contre les intoxications alimentaires, les micro-organismes et les organismes fécaux (**Daferera et al., 2000; Vági et al., 2005**).

Les extraits de marjolaine présentent de grandes opportunités pour être incorporés dans différents produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques en raison de leur aptitude à éliminer la prolifération des bactéries dans tout environnement alimentaire ou cosmétique (**Vági et al., 2005**).

Les huiles essentielles (HE) dérivées des feuilles de marjolaine ont montré un effet antibactérien sur diverses bactéries (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase*, *Enterobacter spp coagulase*, *Enterobacter spp*, *Proteus spp*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella spp* et *Pseudomonas spp.*) (**Busatta et al., 2008, Freire, 2011**). Les extraits éthanoliques et aqueux de Marjolaine ont également démontré une activité antimicrobienne à l'encontre des bactéries Gram positives et Gram négatives. L'extrait éthanolique a démontré un fort effet inhibiteur sur les bactéries, au même titre que l'extrait aqueux (**Mohamed et al., 2011**).

### 6.1. Activité antibactérienne

Puisque les composants des HES varient de manière quantitative et qualitative, leur activité antimicrobienne n'est pas due à un mécanisme unique, mais à une combinaison de plusieurs modes d'action impliquant diverses cibles cellulaires (ADN, ARN, paroi, ribosomes, membrane cytoplasmique) (**Burt, 2004**). Le blocage de ses fonctions ou la mort cellulaire peuvent être causés par une interruption de processus métaboliques ou une perturbation de la structure ou de la fluidité d'une cellule bactérienne. Dans une dose spécifique, cette action se traduit par un effet antibactérien. L'efficacité d'une huile essentielle contre un agent pathogène

est évaluée en utilisant la concentration minimale inhibitrice (CMI) et/ou la concentration minimale inhibitrice (**Jawetz *et al.*, 1973; Prescott *et al.*, 2018**).

## **6.2. Activité antifongique**

Les huiles essentielles et leurs composants ont aussi une capacité à combattre les champignons, une capacité qui est de plus en plus expliquée. Les huiles ont été très sensibles à de nombreux pathogènes fongiques humains, animaux et agricoles. Indispensables *in vitro*, ce qui suscite davantage d'intérêt pour leur utilisation dans le domaine médical ou industriel. L'huile essentielle présente un fort potentiel antifongique. (**Moghaddam *et al.*, 2016**).

En effet, une étude a démontré que les HEs diminuent le volume des cellules fongique, induit une fragilisation du biofilm et par conséquent son inhibition (**Barbosa *et al.*, 2019**).

Les terpènes et flavonoïdes lipophiles sont les principaux agents responsables de cette toxicité fongique, car ils interagissent avec les éléments membranaires et altèrent leur structure (**Barbosa *et al.*, 2019**).



**Chapitre II**

***Matériel et  
méthodes***

## Matériel et méthodes

Le travail expérimental, ayant pour l'objet de l'évaluation *in vitro* de l'activité anti microbienne de l'huile essentielle de la plante médicinale *Origanum majorana L.*, la partie pratique a été effectuée dans les laboratoires de biochimie et de microbiologie de l'université Abbes Laghrour-Khenchela.

### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel biologique

##### 1.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est composé de la partie aérienne sèche de la plante *d'Origanum majorana L.*, récupérée chez un herboriste spécialisé, puis pulvérisée au broyeur pour obtenir une poudre fine. Elle est stockée dans un récipient en verre fermé hermétiquement jusqu'à ce qu'elle soit utilisée.

##### 1.1.2. Souches bactériennes et fongiques

Afin de tester le potentiel antimicrobien de l'HE *d'Origanum majorana -in vitro-*, quatre souches de référence provenant du laboratoire pédagogique de l'université Abbes Laghrour (**Tab3**), Dix-huit souches bactériennes cliniques (**Tab4**), ainsi que deux champignons (**Tab5**), ont été utilisés.

**Tableau 3 :** Souches bactériennes de référence utilisées pour le test de sensibilité.

Souche	Gram	Code
<i>Bacillus cereus</i>	+	ATCC11778
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC27923
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	ATCC700603
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC25922

**Tableau 4:** Souches bactériennes cliniques utilisées pour les tests de sensibilités.

ATB \ Souche	<i>Escherichia coli</i>										<i>Enterobact</i>	<i>Poteusspp</i>	<i>Klebsiellap pneumoniae</i>	<i>Pseudaer</i>			
AMOXICILLINE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	\
AMOX+ACCLAVU LANIQUE	R	R	S	R	S	I	S	R	R	R	R	S	I	S	S	R	\
PIPERACILLINE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
CEFAZOLINE	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	\

CEFOXITINE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	\
CEFOTAXIME\ IMIPENEME	R\ S	S\ S	S\ S	S\ S	S\ S	S\ S	S\ S	S\ S	S\ S	S\ S	R\ S	S\ S	S\ S	S\ S	S\ S	\
GENTAMICINE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
FOSFOMICINE	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	\
CIPROFLOXACIN E	S	I	S	I	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R
AC NALIDIXIQUE	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	_
FURANES	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	\
TRIMETHOPRIM E\ SULFAMETHOXA ZOLE	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R
CHLORAMPHENI COLE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
COLISTINE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
TRIOCCILLINE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	\
TICARCILLINE	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	R
TICARCILLINE+A C CLAVULANIQUE	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	S
CEFTAZIDIME	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	S
CEFIPIME	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	S
IMIPENEM	\	I	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	R
AMIKACINE	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	R
AZETRONEM	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	S

Tableau 5: Souches fongiques utilisées pour le test de sensibilité.

Souche	Code
<i>Aspergillus niger</i>	2CA936
<i>Candida albicans</i>	Souche clinique

## 1.2. Réactifs chimiques et instrumentations

Quelques réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits : diméthylsulfoxyde (DMSO), acide Sulfurique, chlorure de Baryum, Tween 80, milieu de culture Muller Hinton Agar, proviennent tous de Sigma-Aldrich. Parmi l'appareillage utilisé : Clevenger (1928), Spectrophotomètre (spectrum SP-UV 2005), Bain Marie (nive bath, MEMMERT), Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOLOGEX), Vortex (VELP), Balance analytique (OHAUS), Balance (KERN PCB), Centrifugeuses (EZ Swing 3K, Rotofix 32 A), Réfrigérateurs (Liebherr), Plaque

chauffante (LabTech) et Autoclave (Raypa).

## 2. Méthodes

### 1. Extraction par hydrodistillation

L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation à l'aide d'un appareil du type Clevenger. Le schéma suivant représente le dispositif d'extraction utilisé (**Fig2**). Le principe consiste à immerger la matière première sèche dans un bain d'eau, ou l'ensemble est porté à l'ébullition et l'opération est conduite à la pression atmosphérique. Les molécules odorantes volatiles et semi-volatiles sont alors entraînées par la vapeur d'eau. Ces vapeurs hétérogènes, au contact du froid, se condensent et deviennent liquides. Le liquide en question est formé d'un mélange d'eau et d'huile essentielle aromatisée. La séparation est ensuite effectuée par simple différence de densité. Cette essence ainsi obtenue est collectée dans un flacon en verre fumé stérile à 4°C (**M'hamdi ,2024**).

Le rendement en HE est exprimé en pourcentage et il est défini par l'équation suivante (**Daouda, 2015**) :

$HE \% = \frac{M'}{M} * 100$  / Avec :  $M'$  : La masse de l'HE obtenue après l'extraction.

$M$  : La masse de la matière végétale utilisée.

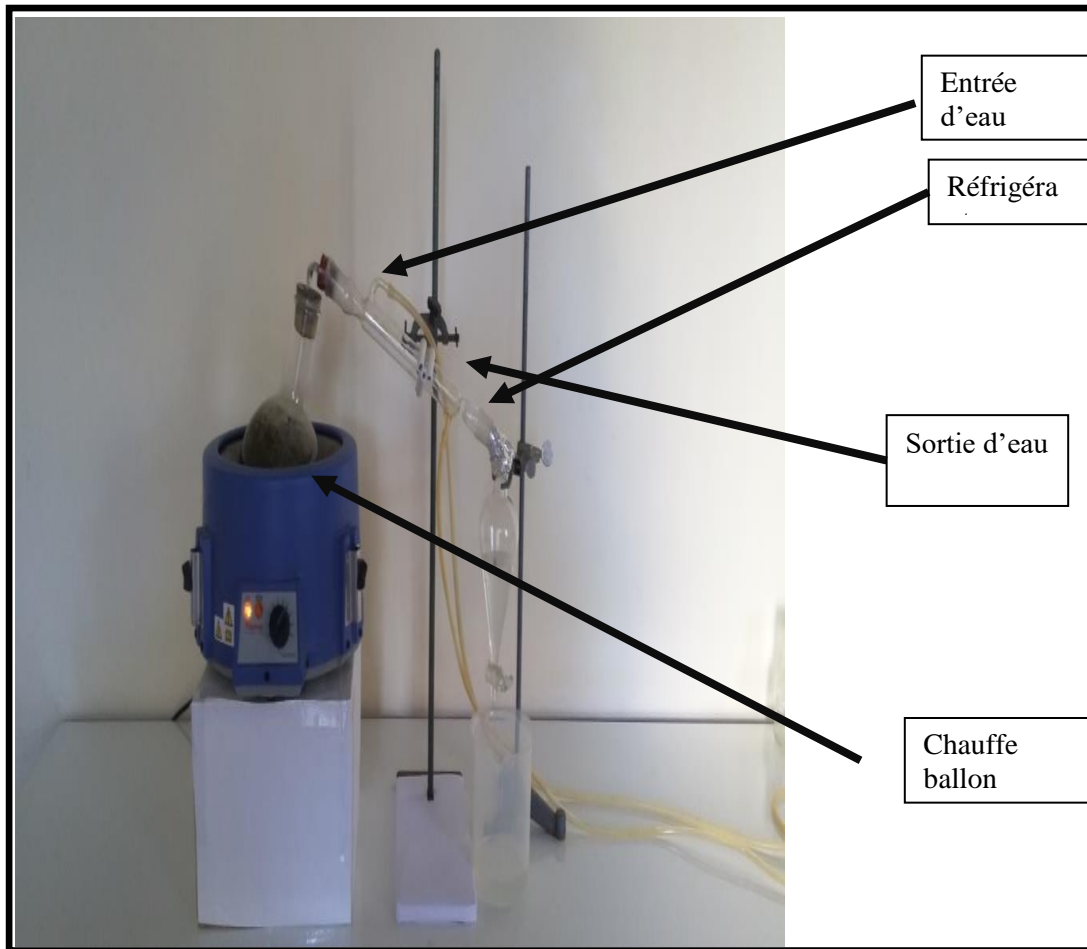


Figure 2 : Procédé d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation.

## 2. Étude *in vitro* des activités biologiques de l'HE

### 2. Etude de l'activité antibactérienne

Dans cette partie, nous sommes à la recherche de composés antibactériens produits à partir de la plante médicinale *Origanum majorana L.*, réputée pour ses propriétés thérapeutiques. La méthode de diffusion en milieux gélosés sur boîtes de pétri a été employée en adaptant la méthode de disques décrite par **Bauer *et al.*, (1966)**. On a mesuré la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE pour les souches qui ont démontré un effet positif.

#### 2.1. Méthode des disques -Test d'efficacité

La méthode utilisée pour étudier le pouvoir antibactérien de l'HE est similaire à celle utilisée pour l'antibiogramme.

##### ➤ Repiquage des espèces bactériennes

Les espèces bactériennes de référence ont été repiquées par la méthode des stries sur

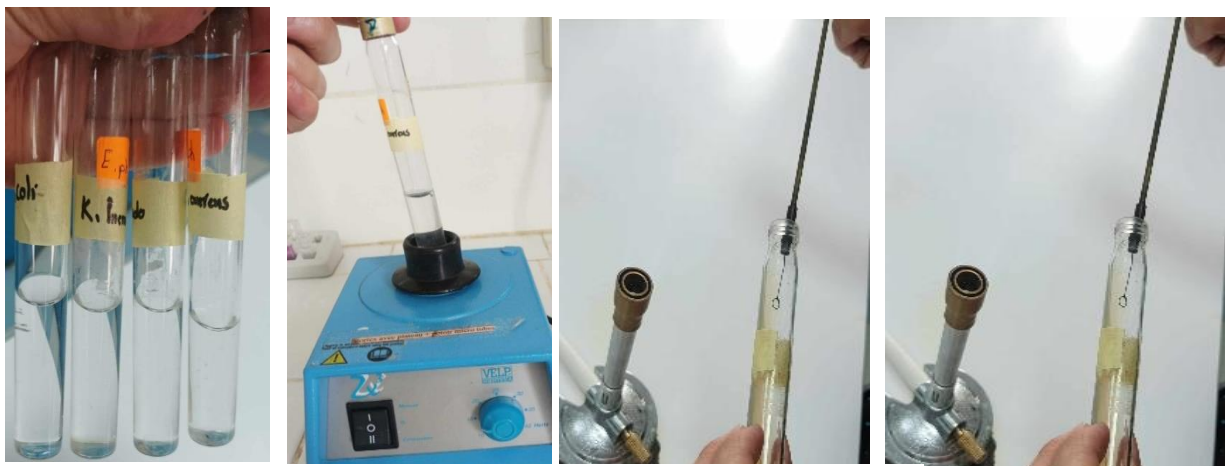
gélose Mueller Hinton, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum (**Fig3**). Dans le cas des souches cliniques, il s'agit d'un groupe de colonies bactériennes conservées dans du glycérol, prélevées à l'aide d'une micropipette et placées dans un bouillon nutritif. On incube ensuite le bouillon dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Une fois incubées, les colonies sont repositionnées sur une gélose nutritive et procédées à une nouvelle incubation.



**Figure 3** : Repiquage des espèces bactériennes.

#### ➤ Préparation de l'inoculum

L'inoculum bactérien a été préparé dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure de 24 h selon la recommandation du CA-SFM (*Marlène et al., 2022*). La densité a été ajustée à 0.5 Mack Ferland (**Annexe 1**) (**Fig4**)

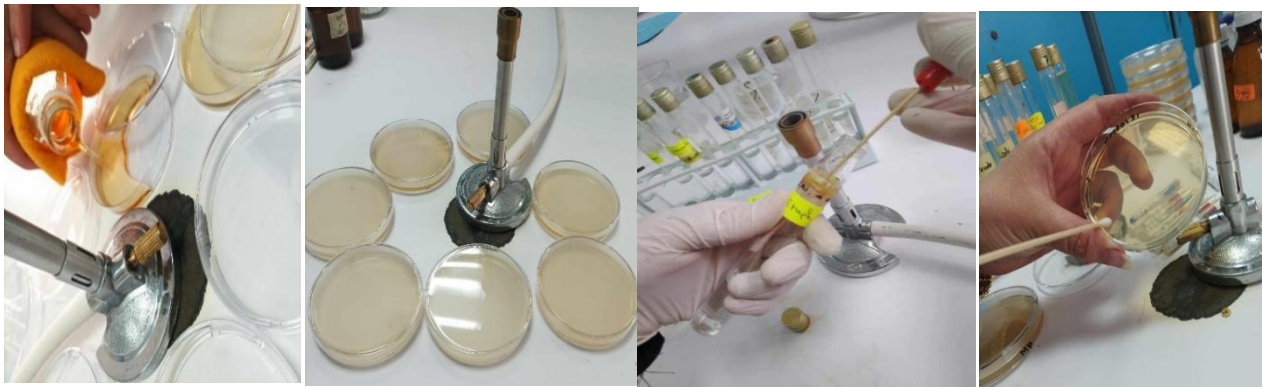


**Figure 4** : Préparation de l'inoculum.

### ➤ Ensemencement

Il est nécessaire d'effectuer l'ensemencement en moins de 15 minutes après la préparation de l'inoculum (**Fig5**). Les étapes de l'ensemencement sont les suivantes (**Marlène et al.,2022**) :

- Ajouter 20 ml de la gélose Muller-Hinton (**Annexe 2**) à chaque boîte de pétri, puis laisser prendre soin de la solidification.
- Insérer un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, le presser fermement et le tourner sur la paroi interne du tube pour le décharger à son maximum.
- Appliquer l'écouvillon sur toute la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en laissant des stries serrées.
- Effectuer cette opération à deux reprises, en tournant la boîte de pétri à 60° à chaque fois, en évitant de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Terminer le processus d'ensemencement en passant l'écouvillon sur la zone entourant la gélose.



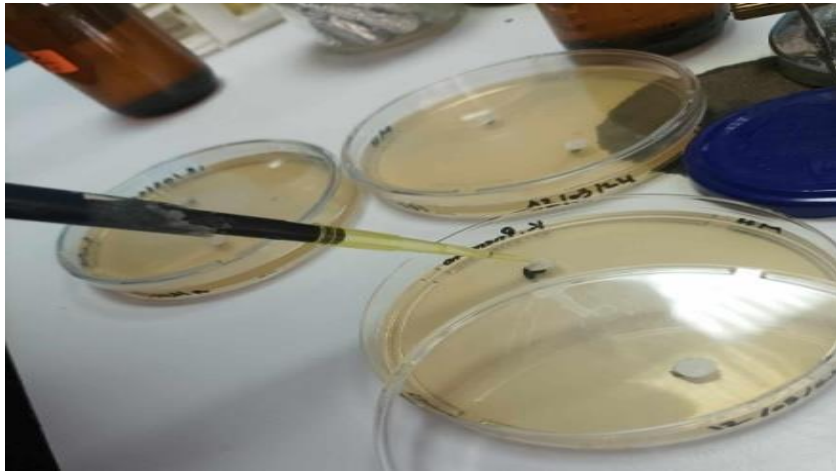
**Figure 5:** Ensemencement des souches bactériennes sur milieu gélosé(MH).

### ➤ Préparation des disques d'aromatogramme

Les étapes de préparation des disques d'aromatogrammes en présence de l'HE sont illustrées dans (**Fig 6**)comme suit :

- Stériliser du papier Wattman n°3 coupés en disques de 6mm de diamètre à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes
- À l'aide d'une pince stérile déposé au centre de chaque moitié de la boîte pétri un disque stérile de papier filtre.
- À l'aide d'une micropipette, ajouté 15µl d'HE.

- Préparer les disques de contrôle négatif imprégnés de diméthylsulf oxyde (DMSO).



**Figure 6:** Préparation des disques d'aromatogrammes en présence d'HE.

➤ **Incubation et lecture**

Les diamètres des zones d'inhibition (ZI) ont été mesurés (**Fig7**) autour des disques après une pré-incubation de 30 minutes à la température ambiante suivie d'une incubation à l'étuve à 37°C pendant 24H. La souche ayant un diamètre  $D < 8\text{mm}$ ,  $9 \leq D \leq 14\text{mm}$ ,  $15 \leq D \leq 19\text{mm}$ ,  $D > 20\text{mm}$  est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++) , extrêmement sensibles (+++) (**Jean-marie et al., 2024**).



**Figure 7 :** Instrument de mesure des diamètres des zones d'inhibition en mm.

### 1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La méthode de micro-dilution a été utilisée pour évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la concentration minimale d'huile essentielle capable d'inhiber la croissance de la population bactérienne en utilisant le bouillon Muller Hinton dans des microplaques à fond en U (**Bardaweel et al., 2015**).

La CMI de l'HE a été déterminée selon le protocole suivant (**Fig 8**) :

- 125 µl du bouillon Muller Hinton plus Tween 80 (0,01%) v/v a été répartis dans tous les puits de la microplaque.
- 15 µl d'HE a été distribué dans les premiers puits de la microplaque et on fait une dilution d'ordre de 2 allant du deuxième puits de la ligne jusqu'à la dernière dilution de la même ligne.
- Les microplaques ont été inoculées avec de 10 µl de la suspension bactérienne (diluée au 1/10ème) pour obtenir un volume final de 150µl.
- Pour chaque expérience, un contrôle positif (milieu inoculé) et un contrôle négatif (milieu avec huile) ont été préparés.

Les microplaques préparées ont été incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, la croissance bactérienne (traduit par une turbidité) a été examinée dans chaque puits ; La CMI de l'HE vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe (**Bolou et al., 2011**).



**Figure 8** : Etapes de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

### 1.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB, également connue sous le nom de Concentration Minimale Bactéricide, représente la concentration la plus faible permettant d'inhiber 99,99% des germes. Après avoir identifié les CMI, on a procédé au test de détermination des CMB en ensemençant tous les puits de la CMI sur la gélose MH, puis en incubant pendant 24 heures à une température de 37°C. Ensuite, on procède à la lecture des boîtes de Pétri. La concentration minimale de chaque mélange est la CMB, qui ne permet de survivre qu'au moins 0,01 % d'inoculum après une incubation de 18 à 24 heures à une température de 37°C (Jean-marie *et al.*, 2024).

### 3. Etude de l'activité antifongique

L'activité antifongique de l'HE a été testée sur deux moisissures : *Aspergillus niger* et *Candida albicans* en suivant le protocole suivant :

#### ➤ Repiquage des souches fongiques

Le processus consiste à réisoler les colonies fongiques de chaque souche sur du glucose agar (PDA) (Annexe 3). En utilisant une anse de platine, on extrait un explant des anciennes boîtes de champignons, puis on l'insère dans le milieu de glucose agar (PDA) et on le maintient dans une étuve à 25 °C pendant 24 heures puis 48 heures.

#### ➤ Préparation de l'inoculum

Les colonies sont obtenues à partir d'une culture pure fraîchement préparée, incubée pendant 48 heures à 25 °C, puis dissoute dans de l'eau physiologique stérile. L'homogénéité de la suspension a été assurée, ce qui équivaut à  $10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup> (Rezzoug *et al.*, 2024).

#### ➤ Méthode de diffusion sur disque

Une petite quantité de culture fraîchement préparée a été répandue sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose dextrose à la pomme de terre. Suite à l'inoculation, des disques stériles de 6 mm de diamètre ont été disposés au centre de toutes les boîtes et ont été imbibés individuellement de 15 µL d'huiles essentielles. Ils ont été conservés à la température ambiante pour favoriser une meilleure diffusion des HE dans le milieu utilisé. Ensuite, ils ont été incubés à 25 °C pendant 48 heures. Les zones inhibitrices ont été évaluées en millimètres, incluant le diamètre du disque (Rezzoug *et al.*, 2024).

#### 4. Caractérisation de l'activité antimicrobienne

D'après le rapport CMB/CMI ou CMF/CMI, il est étudié si l'effet antibactérien est bactéricide ou bactériostatique (**Jean Marie *et al.*, 2024**). Les résultats sont interprétés de la façon suivante : Si  $1 \leq \text{CMB/CMI} \leq 4$  ou  $1 \leq \text{CMF/CMI} \leq 4$  : l'effet est bactéricide ou fongicide. En ce qui concerne  $4 < \text{CMB/CMI} \leq 16$  ou  $4 < \text{CMF/CMI} \leq 16$  : l'effet est soit bactériostatique, soit fongistatique.



**Chapitre III**

***Résultats et  
discussion***

## Résultats et discussion

L'objectif de cette étude était d'évaluer *in vitro* l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites par hydrodistillation à partir de la partie aérienne d'une plante médicinale, à savoir « *Origanum majorana L.* », et ceci vis à vis quatre bactéries de référence, dix-huit bactéries cliniques et deux souches fongiques.

### 1. Rendement de l'extraction

L'huile essentielle obtenue de la *marjolaine* est un liquide visqueux, limpide, d'une coloration jaunâtre et odeur forte. Le rendement de l'extraction est exprimé en pourcentage massique (g/100g) par rapport à la matière sèche (**Tab6**) :

**Tableau 6:** Rendement de l'extraction de l'huile essentielle *Origanum majorana L.*

Plante	Extrait	Poids du matériel végétal (g)	Poids de l'HE (g)	Rendement
<i>Origanum majorana L.</i>	HE	562	0.591	0,105 %

Les différences constatées dans les performances en huiles essentielles à la région de collecte de la plante ainsi qu'à divers facteurs (biotiques et abiotiques). Le milieu et la période de récolte, la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents, les techniques de culture et la méthode d'extraction sont parmi ces éléments.

Le rendement en HE obtenu (**Tab 6**) est de l'ordre de 0.105% par rapport à la matière sèche utilisée (drogue végétale). Cette valeur est très inférieure de l'intervalle théorique (0.7–3.5%) proposé dans les pharmacopées à travers les continents, et contredisent à celle trouvée par **Sefsafe ,(2016)** qui a été 1.1% pour matériel végétal sèche et 0.38% pour matériel végétal frais, aussi au rendement trouvé par **Chenna ,(2018)** à savoir 0.61% par rapport à la matière sèche. Cette différence de rendement, décrite par la bibliographie, peut être attribuée à la région de collecte de la plante ainsi qu'à divers facteurs (biotiques et abiotiques), l'influence des facteurs environnementaux, comme la température, l'humidité, l'altitude, la nature du sol et d'autres facteurs tels que le cycle végétatif, la période de récolte, les parasites, les virus et les mauvaises herbes (**Zeković et al., 2009 ; Zerrouk, 2019**)

## 1. L'activité antimicrobienne

Le résultat de sensibilité de l'huile essentiel obtenu a été mis en évidence par la méthode de diffusion en milieu solide Mueller Hinton (MH), il paraît évident que toutes les souches bactériennes testées ont présenté une sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle en suivant la méthode réalisée selon la recommandation du CA-SFM (Marlène *et al.*, 2022).

La sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis les huiles essentielles est très variable, selon Jean-Marie, (2024), cette sensibilité permet de classer les bactéries en fonction du diamètre de la zone d'inhibition dont la souche ayant un diamètre  $D < 8\text{mm}$ ,  $9 \leq D \leq 14\text{mm}$ ,  $15 \leq D \leq 19\text{mm}$ ,  $D > 20\text{mm}$  est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++) , extrêmement sensibles (+++).

### 1.1. Résultat de l'activité antibactérienne

#### 1.1.1. Effet de l'HE sur les bactéries de référence

L'ensemble des résultats sont regroupés dans le (Tab7) et les (Figs 9 et 10) :

**Tableau 7** : Diamètres des zones d'inhibition induites par l'HE d'*O majorana L.* contre les souches bactériennes de référence testées.

Bactéries testées	Gram	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	14
<i>Escherichia coli</i>	-	12
<i>Bacillus cereus</i>	+	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	26

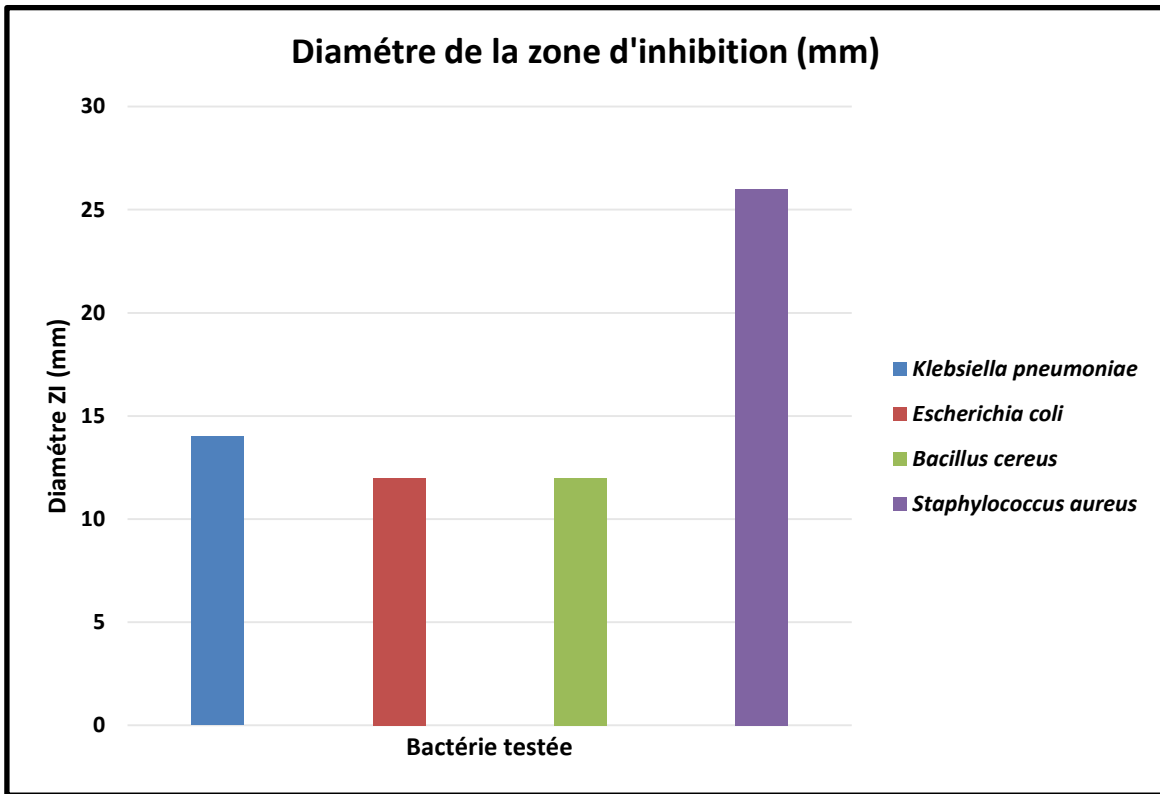


Figure 9 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne des souches de référence testées

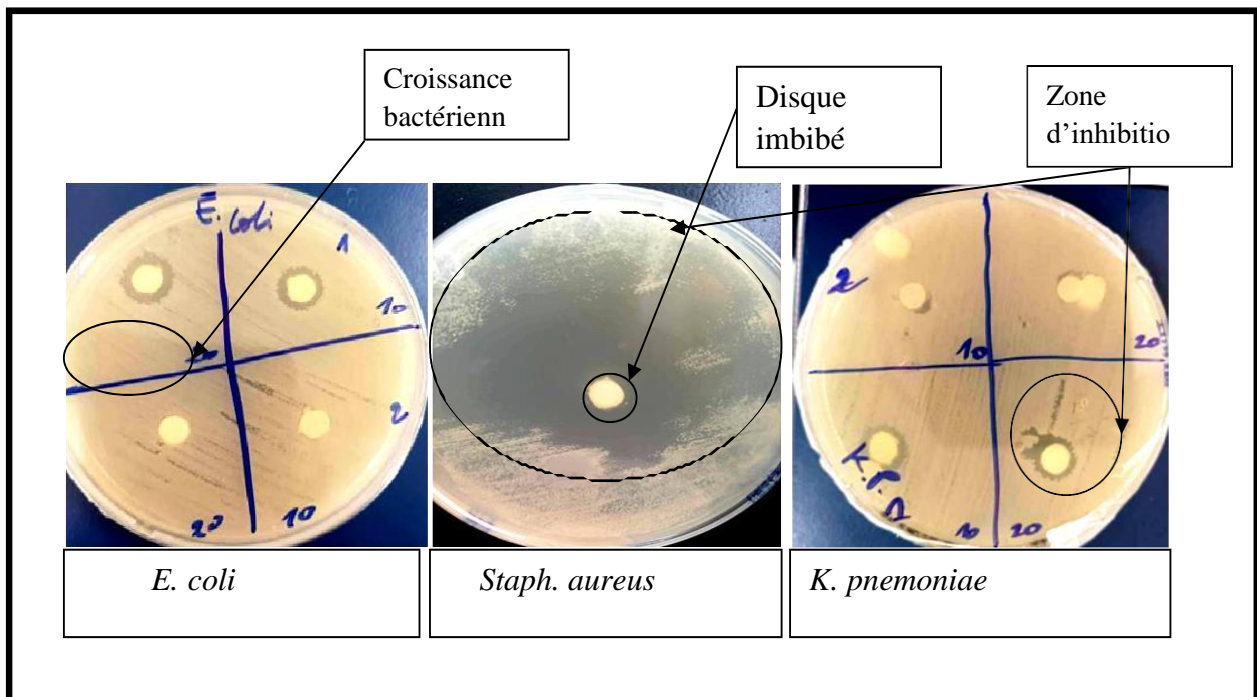
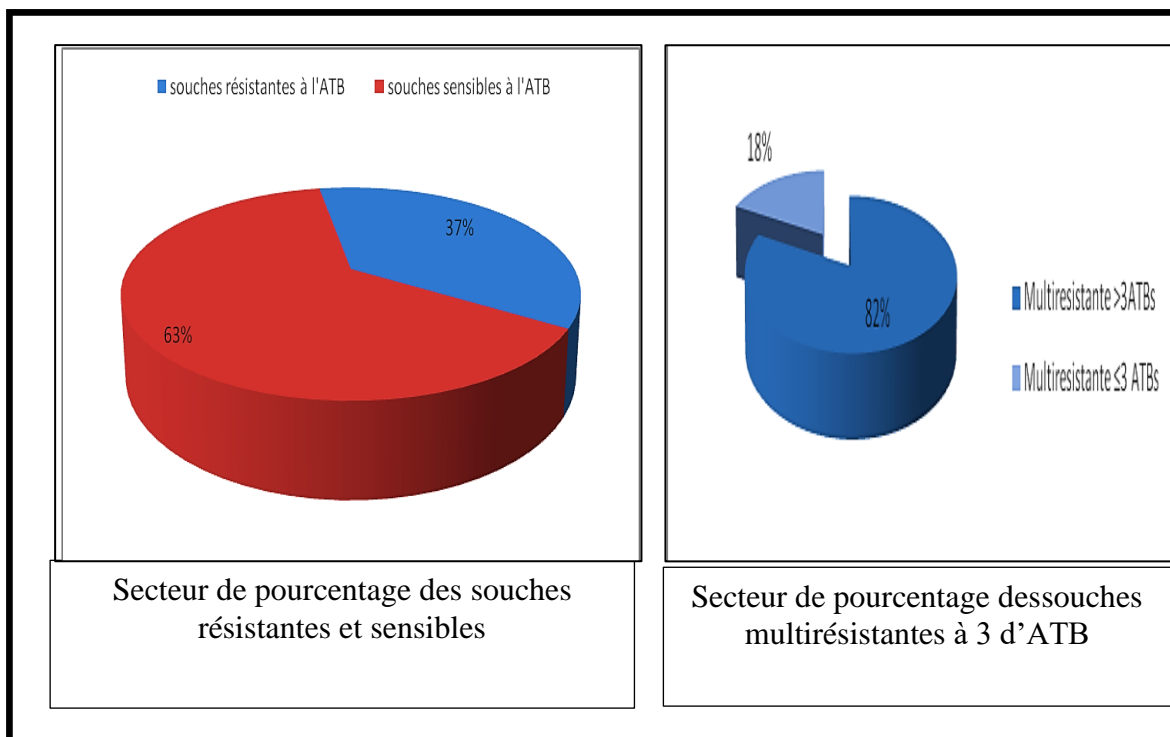


Figure 10 : Zones d'inhibition induite par l'HE d'*O. majorana L.* contre les souches de référence testées.

D'après les résultats obtenus (Tab 7) et (Figs 9 et 10), nous constatons que l'huile essentielle de lamarjolaine est dotée d'une activité inhibitrice extrême sur *Staphylococcus aureus* traduite par un diamètre de zone d'inhibition de 26 mm, alors que pour les autres souches *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, elle présente une activité inhibitrice moyenne traduite par des diamètres de la zone d'inhibition de l'ordre de 14mm ,12mm et 12mm respectivement. Selon une étude menée par **Ben Salha ,(2020)**, il a été observé que l'huile d'*Origanum majorana* avait un effet modéré sur *E. coli* et *S. aureus*, avec des zones d'inhibition de 12,1 mm et 13,1 mm, respectivement. Ces résultats correspondent à nos résultats pour *E. coli*, mais pas pour *S. aureus*, qui a été extrêmement sensible. De la même manière, une autre étude précédente réalisée par **Sultan Abu-Ghazal ,(2022)** a montré une activité antibactérienne modérée contre *Klebsiella pneumoniae*, avec une zone d'inhibition de 7,1 mm, ce qui contredit également nos résultats. En réalité, cette réactivité prouvée *in vitro* peut être liée au nombre d'hydroxyles libres au niveau des monoterpènes qui sont le principal constituant des HEs (**Zeghad, 2009**). Selon **Cowan ,(1999)**, il était supposé que les huiles essentielles dépourvues de groupements hydroxyles libres présentent une activité antimicrobienne supérieure à ceux qui en sont pourvus.

### 1.1.2. Effet de l'HE sur les bactéries cliniques



**Figure 11 :** AntibioGramme des souches cliniques testées.

D'après les résultats obtenus (**Fig 11**), les souches cliniques testées sont résistantes à 37%, dont une bactérie qui résiste à au moins 3 familles d'antibiotiques est appelée bactérie multirésistante (BMR) (**Lozniewski et Rabaud, 2010**). Dans notre étude 82% des souches résistantes étaient des BMR ; ces résultats révèlent que le taux de résistance aux antibiotiques est accru chez la plupart des souches d'origine hospitalières.

**Tableau 8** : Diamètres des zones d'inhibition induites par l'HE d'*O majorana L.* contre les souches cliniques testées.

Bactéries testées/ Gram <sup>-</sup>	Zones d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli 01</i>	12.14
<i>Escherichia coli 02</i>	14.14
<i>Escherichia coli 03</i>	18.69
<i>Escherichia coli 04</i>	20.67
<i>Escherichia coli 05</i>	19.52
<i>Escherichia coli 06</i>	23
<i>Escherichia coli 07</i>	19.08
<i>Escherichia coli 08</i>	12
<i>Escherichia coli 09</i>	15.26
<i>Escherichia coli 10</i>	Résistante
<i>Klebsiella pneumoniae 01</i>	9
<i>Klebsiella pneumoniae 02</i>	15
<i>Klebsiella pneumoniae 03</i>	12
<i>Proteus spp 01</i>	13.37
<i>Proteus spp 02</i>	14
<i>Proteus spp 03</i>	22.46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18.02
<i>Enterobacter spp</i>	18.69

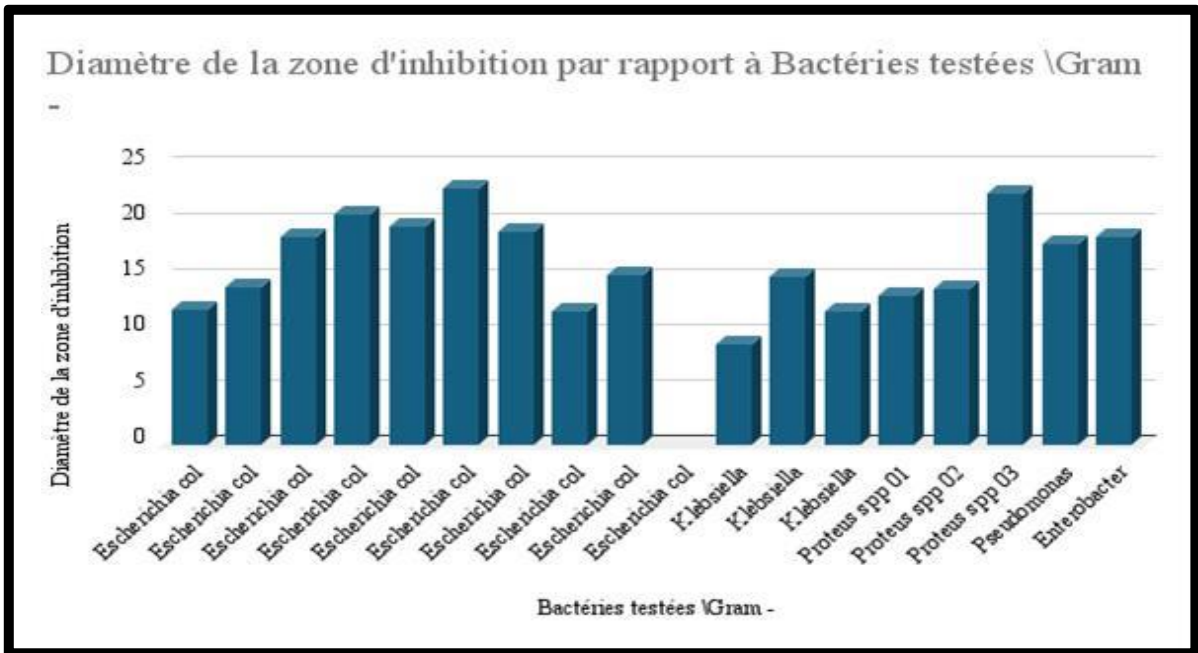


Figure 12: Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne des souches cliniques testée.

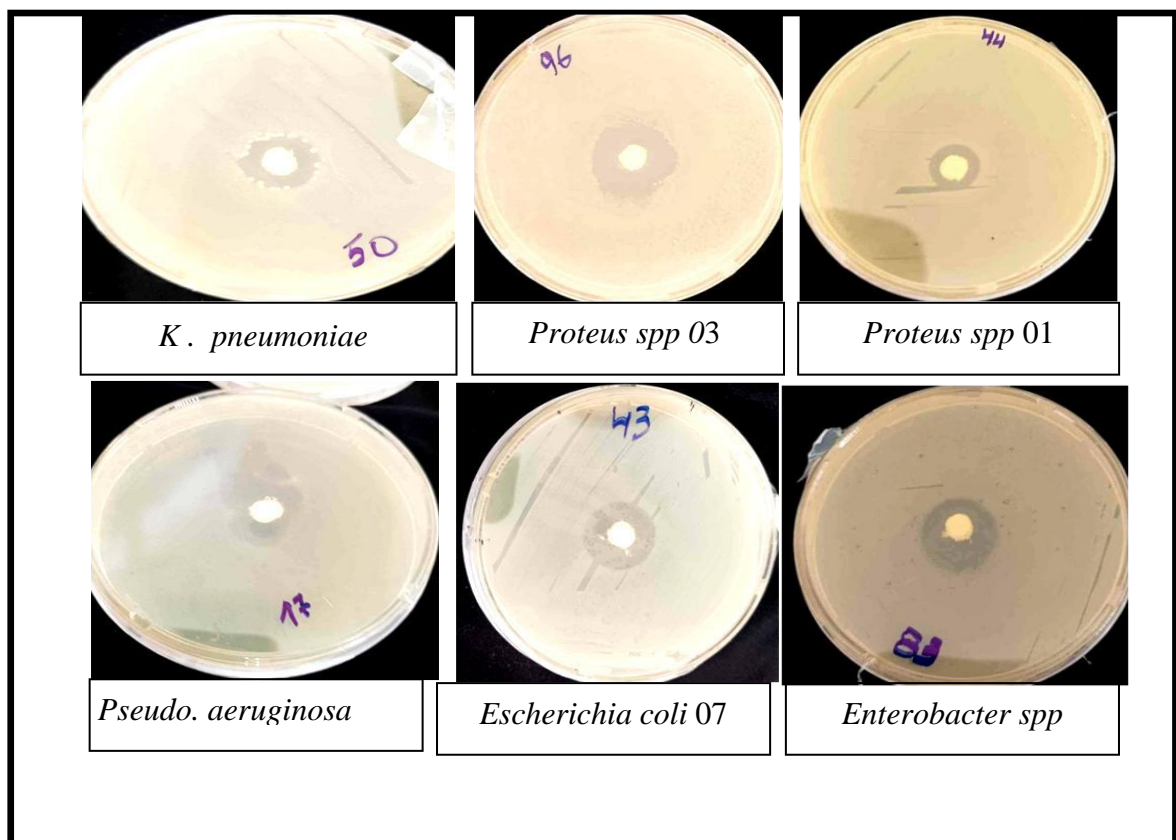


Figure 13: Zones d'inhibition induites par l'HE *d'O majorana L.* contre les souches cliniques testées.

D'après les résultats enregistrés sur (Tab 8) et (Figs 12 et 13), on remarque que notre huile essentielle extraite d'*Origanum majorana* L., présente des activités antibactériennes variables sur les souches Gram négatif testées; dont une activité inhibitrice extrême exercée sur *Escherichia coli* (04, 06) et *Proteus spp* 03, traduite par des diamètres de zone d'inhibition égale à 20.67, 23 et 22.46 mm respectivement, une activité inhibitrice importante contre : *Escherichia coli* (03,05, 07, 09), *Klebsiella pneumoniae* 02, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp*, exprimée par des diamètres de zone d'inhibition de 18.69, 19.52, 19.08, 15.26, 18.02 et 18.69 mm, respectivement; dont elles sont très sensibles à l'aromatogramme, une activité inhibitrice moyenne vis-à-vis *Escherichia coli* (01, 02, 08), *Klebsiella pneumoniae* (01,03) et *Proteus spp* (01,02), avec des diamètres de zone d'inhibition qui varient entre 9 et 14.14 mm, tandis que *Escherichiacoli* 10 est parait résistante. Nos résultats sont cohérents avec une étude de **Snieszana, (2021)**, concernant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Origanum majorana*, *Origanum compactum* et *Thymus serpyllum* sur 30 isolats cliniques de *Klebsiella pneumoniae*, qui est l'un des agents pathogènes les plus préoccupants en termes de résistance aux antibiotiques, ainsi que d'autres agents pathogènes multirésistants (MDR) très importants, classés dans la catégorie ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*) En conséquence, cette étude montre que l'huile essentielle d'*Origanum majorana* a une activité antimicrobienne contre la majorité des isolats avec une sensibilité de 80% au volume 50 et conclut que cette huile a un effet significatif sur les bactéries Gram-négatives. De plus, il a été démontré que les composantes majoritaires de HE : 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**).

Selon nos résultats, toutes les BGN testées sont considérées comme sensibles à l'huile essentielle de la marjolaine. Cependant, malgré la présence d'une couche de lipopolysaccharide (LPS) chez les BGN, cette barrière pourrait être efficace (**Chemloul, 2014**). Cependant, l'absence de cette barrière chez les BGP permet le contact direct des composants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, ce qui entraînerait soit une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience du système enzymatique (**Sandri et al., 2007**). Nos résultats ne sont pas en accord avec les recherches menées par les chercheurs (**Derwich et al., 2010**), (**Bari et al., 2010**), (**Zarai et al., 2011**), (**Boughendjioua, 2017**), qui ont confirmé la sensibilité élevée des BGP par rapport à celles Gram négatif.

Bien que la méthode de diffusion soit simple, rapide et applicable à tout type de substance antimicrobienne et tout micro-organisme, elle porte toujours des difficultés notamment dans l'interprétation des résultats des huiles essentielle vu que dans ce cas les zones d'inhibition doivent être affectées par plusieurs facteurs tels que : la mauvaise diffusion des huiles essentielles dans la gélose à cause de leur nature hydrophobe, leur volatilisation et la capacité limitée des disque à absorber un volume suffisant de l'extrait à examiner de ce fait, cette méthode à été limité au criblage des activités antibactériennes qui doit être complété ensuite par une mesure de la sensibilité des micro-organismes à l'augmentation de la dose de l'extrait naturelle et la détermination de la CMI.

### 1.2. Détermination de concentration minimale inhibitrice et bactéricide (CMI et CMB)

L'évaluation de la sensibilité bactérienne à l'HE de *Origanum majorana* L., consiste à analyser la réponse bactérienne à des concentrations définies de cette HE. Cette approche a été déterminée en mesurant la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide.

La détermination de la CMB de l'HE a été effectuée sur les bactéries ayant présentées une sensibilité par le test des CMI.

#### ➤ Cas des souches de références

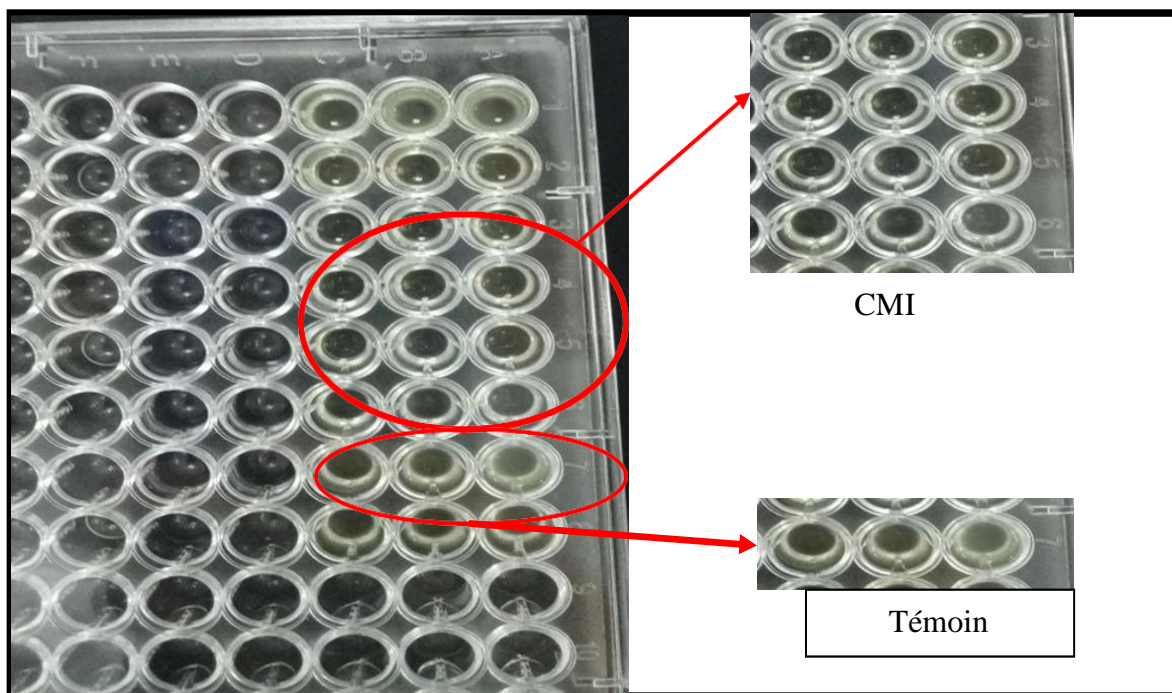
Les résultats des CMI et des CMB obtenues sont représentés dans le( **Tab 9**) et les( **Figs 14,15 et 16**) :

**Tableau 9** : Résultats de CMI et CMB des souches bactériennes de référence testées.

Bactérie testée	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/CMI	Effet antibactérien
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	20	1.25	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	33	100	3.03	Bactéricide
<i>Bacillus cereus</i>	50	100	2	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	100	2	Bactéricide

Les résultats de la CMI montre qu'en présence de l'HE de l'*Origanum majorana L*, les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* sont inhibées à la concentration 50mg/ml et c'est la concentration la plus élevée, par contre *E.coli* est inhibée à 33mg/ml et *K.pneumoniae* est inhibée à 16mg/ml uniquement (**Fig 14**). Dans l'étude de **Ezzoubi ,(2016)**, la CMI de l'HE de *la marjolaine* était inhibitrice de la croissance bactérienne des souches *S.aureus*, et *Bacillus cereus* à 25 mg /ml.

Les résultats de la CMB présentent une action bactéricide pour les souches *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* à 100mg/ml, ainsi qu'elle a un effet bactéricide sur *Klebsiella pneumoniae* à 20mg/ml (**Fig15**).



**Figure 14** : La lecture de la CMI de l'HE contre les souches référentielles.

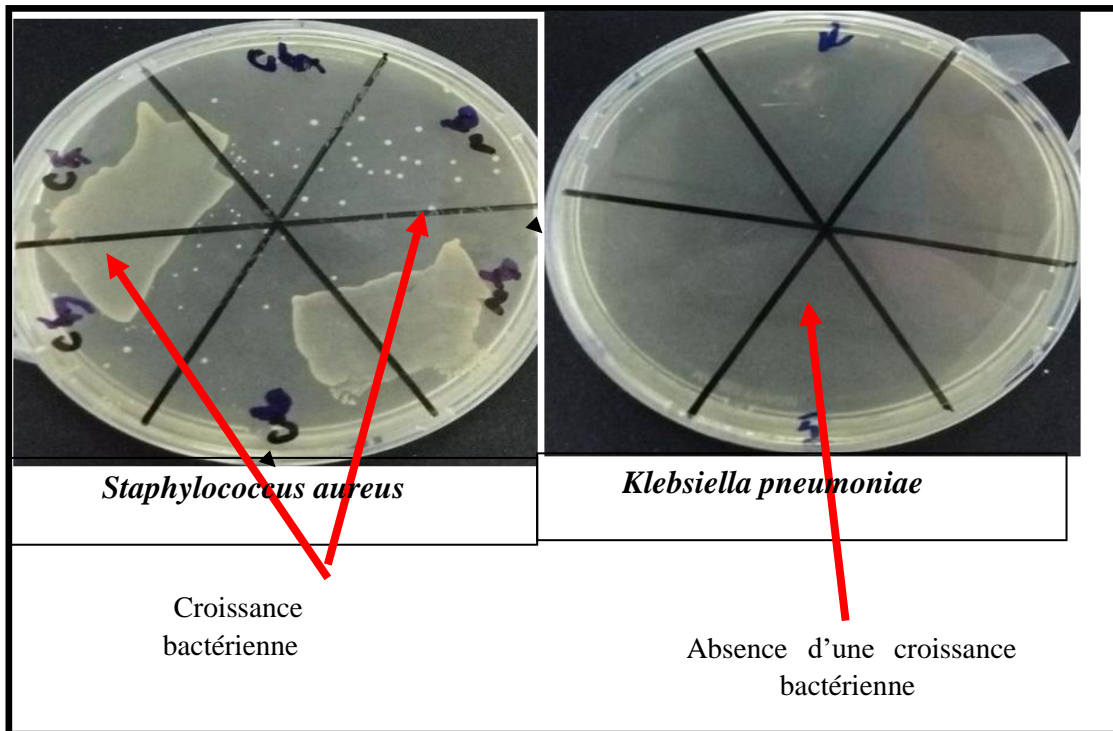


Figure 15: La lecture de la CMB de l'HE contre les souches référentielles.

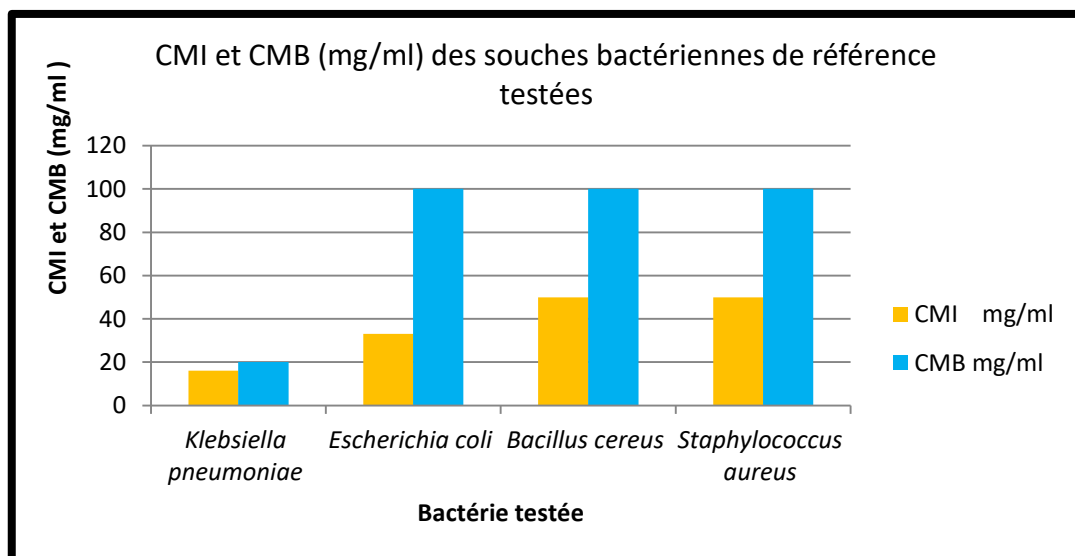


Figure 16: Histogramme des CMI et CMB des souches bactériennes de référence testées.

## ➤ Cas des souches cliniques

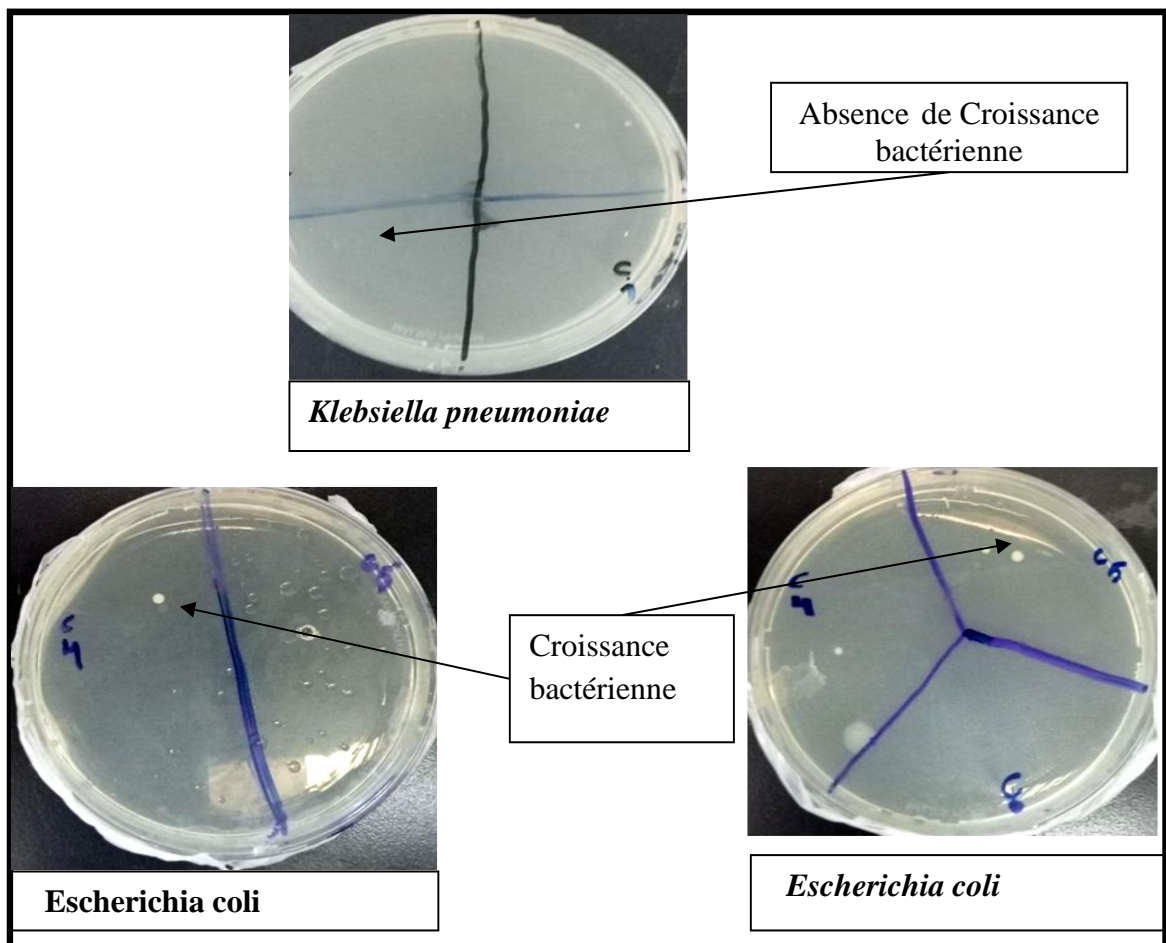
Les résultats des CMI et des CMB évaluées sont représentés dans le (Tab 10) et les (Figs 17 et 18) :

**Tableau 10** : Résultats de CMI et CMB des souches bactériennes cliniques testées.

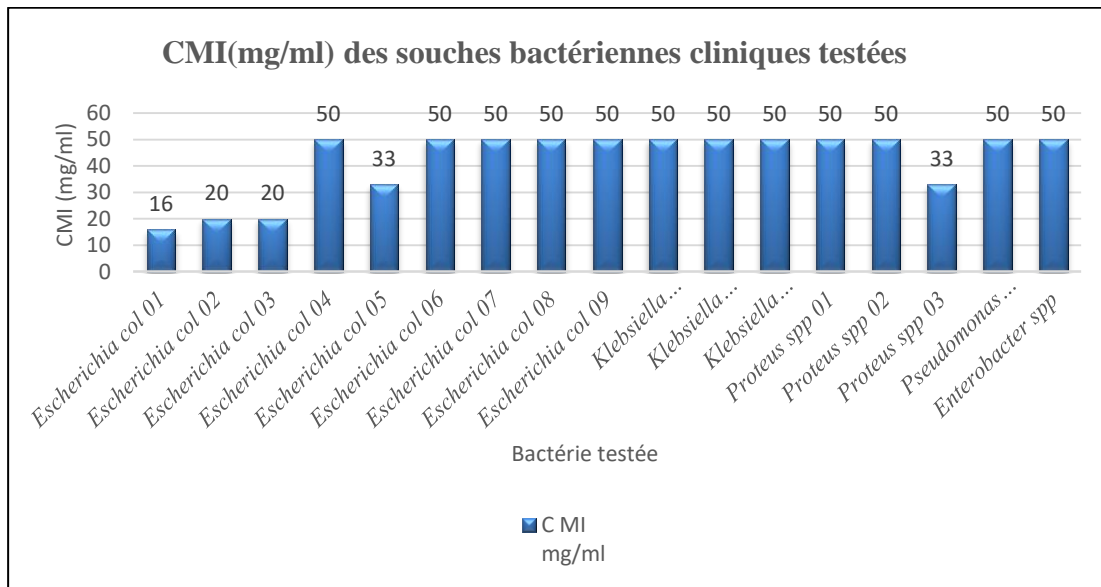
Bactérie testée /Gram <sup>-</sup>	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/CMI	Effet antibactérien
<i>Escherichia coli 01</i>	16	20	1.25	Bactéricide
<i>Escherichia coli 02</i>	20	25	1.25	Bactéricide
<i>Escherichia coli 03</i>	20	25	1.25	Bactéricide
<i>Escherichia coli 04</i>	50	100	2	Bactéricide
<i>Escherichia coli 05</i>	33	100	3.03	Bactéricide
<i>Escherichia coli 06</i>	50	100	2	Bactéricide
<i>Escherichia coli 07</i>	50	100	2	Bactéricide
<i>Escherichia coli 08</i>	50	100	2	Bactéricide
<i>Escherichia coli 09</i>	50	100	2	Bactéricide
<i>Klebsiella pneumoniae 01</i>	50	+	+	Bactériostatique
<i>Klebsiella pneumoniae 02</i>	50	100	2	Bactéricide
<i>Klebsiella pneumoniae 03</i>	50	100	2	Bactéricide
<i>Proteus spp 01</i>	50	100	2	Bactéricide
<i>Proteus spp 02</i>	50	100	2	Bactéricide
<i>Proteus spp 03</i>	33	100	3.03	Bactéricide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	100	2	Bactéricide
<i>Enterobacter spp</i>	50	100	2	Bactéricide

Les résultats de la CMI montrent qu'en présence de l'HE de *Origanum majorana L.*, les bactéries *Escherichia coli* (04,06,07,08,09), *Klebsiella pneumoniae* (01,02,03), *Proteus spp* (01,02), *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp* sont inhibées à la concentration 50mg/ml et c'est la concentration la plus élevée, par contre *Escherichia coli* 05 et *Proteus spp* 03 sont inhibées à 33mg/ml, *Escherichia coli* 01 et *Escherichia coli* (02,03) sont inhibées à 16 mg/ml et 20 mg/ml d'HE respectivement

Quant aux résultats de la CMB, nos calculs confirment l'action inhibitrice de l'HE sur *Klebsiella pneumoniae* 01 à 50mg/ml, par contre elle présente une action bactéricide pour les souches *Escherichia coli* (04,06,07,08 et 09), *Klebsiella pneumoniae* (02,03), *Proteus spp* (01,02 03), *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp* à 100mg/ml, ainsi qu'elle a un effet bactéricide sur *Escherichia coli* 01 et *Escherichia coli* (02,03) à 20mg/ml et 25mg/ml respectivement.



**Figure 17** : La lecture de la CMB des huiles essentielles contre les souches cliniques



**Figure 18** : Histogramme des CMI de l'HE contre les souches bactériennes cliniques testées

La valeur de la CMI peut être influencée également par la quantité de l'émulsifiant utilisée. Cependant, l'ajout d'un émulsifiant au cours de l'étude de l'activité antibactérienne peut limiter le contact entre l'huile essentielle et la bactérie à tester. Cette constatation a été remarquée lors de l'utilisation d'une quantité élevée de l'émulsifiant. De même, la CMI peut être affectée par la méthode de sensibilisation employée : vu que les valeurs de la CMI obtenues par la méthode de dilution en milieu liquide sont plus faibles que celles obtenues en milieu solide, cette même constatation a été rapportée par **Hammer**, (1999), lors de l'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles de 20 plantes médicinales. Cette différence hautement significative des CMI entre les deux méthodes de dilution peut être expliquée par l'influence de certains facteurs qui varient selon l'environnement du test. Ceux-ci comprennent : la différence de l'exposition des bactéries à l'huile essentielle, la différence de la solubilisation de l'huile essentielle et notamment de ses composants actifs et de sa vaporisation.

Selon les résultats obtenus il nous a parait évident que la méthode de dilution en milieu liquide est la méthode adéquate pour l'évaluation de l'activité antibactérienne d'une huile essentielle vue que la volatilisation de l'huile est minimisée un peu en présence d'un milieu liquide ainsi que son amélioration par l'ajout de l'agar qui augmente la durée de stabilité du mélange (huile essentielle + milieu de culture) contrairement à la méthode de dilution en milieu solide où nous avons eu une sur évaluation de l'activité à cause de la volatilisation élevée de l'huile essentielle .

### 1.3. Résultats de l'activité antifongique

L'activité antifongique est étudiée en évaluant l'inhibition de la croissance des micro-organismes en contact avec l'huile essentielle d'*Origanum majorana* L., dans cette expérience, nous avons utilisé la méthode de l'aromatogramme (technique de diffusion dans un milieu solide).

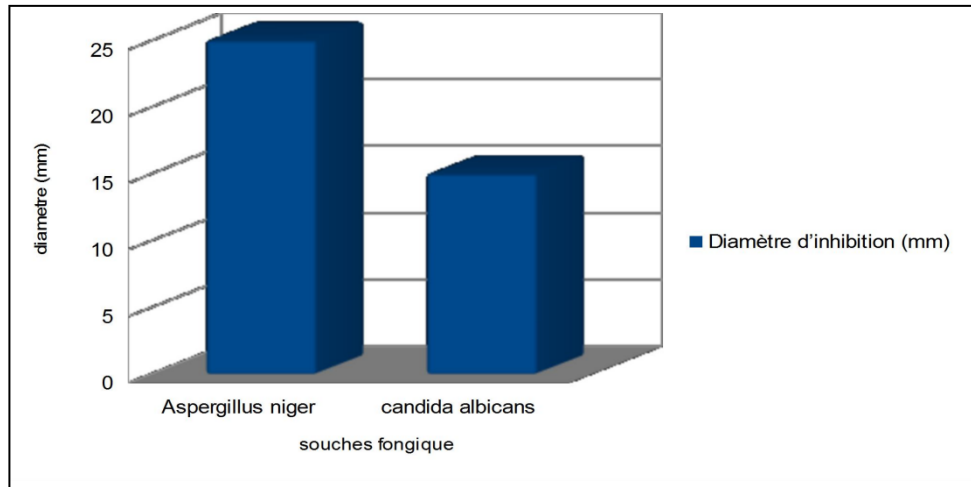
#### ➤ Méthode de diffusion sur disque

L'huile essentielle de la marjolaine montre une activité antifongique très importantes, avec des zones d'inhibition dépassant 14 mm, dont les résultats sont figurés dans le (Tab11) et les (Figs 19 et 20).

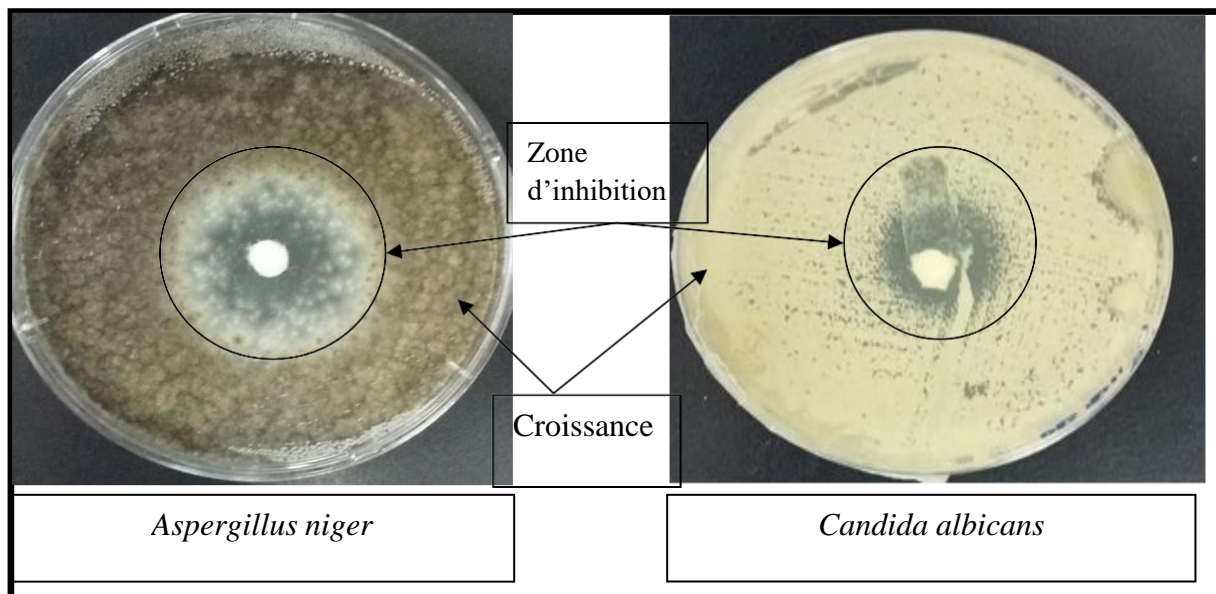
**Tableau 11** : Diamètres des zones d'inhibition de l'HE vis-à-vis les souches fongiques testées.

Souche fongique	Zone d'inhibition (mm)
<i>Aspergillus niger</i>	25
<i>Candida albicans</i>	15

Les résultats obtenus concernant l'analyse qualitative de l'activité antifongique sont captivants. Effectivement, l'huile essentielle possède une activité antifongique considérable, ce qui se manifeste par un diamètre de la zone d'inhibition de 25 mm pour *Aspergillus niger* et de 15 mm pour *Candida albicans*.



**Figure 19** : Histogramme des diamètres des ZI de la croissance des souches fongiques testées.



**Figure 20** : Zone d'inhibition induites par L'HE contre les souches fongiques testées.

Nos résultats concernant l'activité antifongique sont à peu près similaires à ceux de **Ben Salha, (2020)**, en ce qui concerne l'activité inhibitrice contre *Candida albicans*, qui a été illustrée par un diamètre de zone d'inhibition de 13 mm. Cependant, nos résultats concernant l'activité inhibitrice contre *Aspergillus niger* sont différents. Les résultats obtenus par la méthode de micro-atmosphère ne reflètent que le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique (%ICF) par l'huile essentielle est moyennement faible après 7 jours d'incubation à  $25 \pm 1,5$

°C, résumés par un diamètre de zone d'inhibition de 25 mm. Notre expérience se distingue de celle de **Sefsafe ,(2016)**, où l'inhibition de la croissance de *Candida albicans* par l'huile de la marjolaine était très forte, c'est-à-dire exagérée, avec un diamètre de la zone d'inhibition de 58 mm par rapport à celle de notre expérience, qui était de 15 mm.





***Conclusion et  
perspectives***



### *Conclusion et perspectives*

L'aromathérapie est une forme de médecine douce dont les effets thérapeutiques sont attribués aux composés aromatiques des huiles essentielles. La grande émergence de l'antibiorésistance représente un problème majeur dans le secteur de santé ; cela justifie la recherche de nouvelles approches thérapeutiques par l'utilisation de plantes médicinales sous leurs différentes formes. Dans ce but, différentes études se sont intéressées à la connaissance des plantes pour découvrir de nouveaux principes actifs pouvant annoncer une révolution de la médecine.

Dans ce travail, l'analyse de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante aromatique très réputée, *Origanum majorana* L, à l'égard des souches de référence, des souches pathogènes d'origine hospitalière et de deux champignons, nous a conduit à la conclusion suivante :

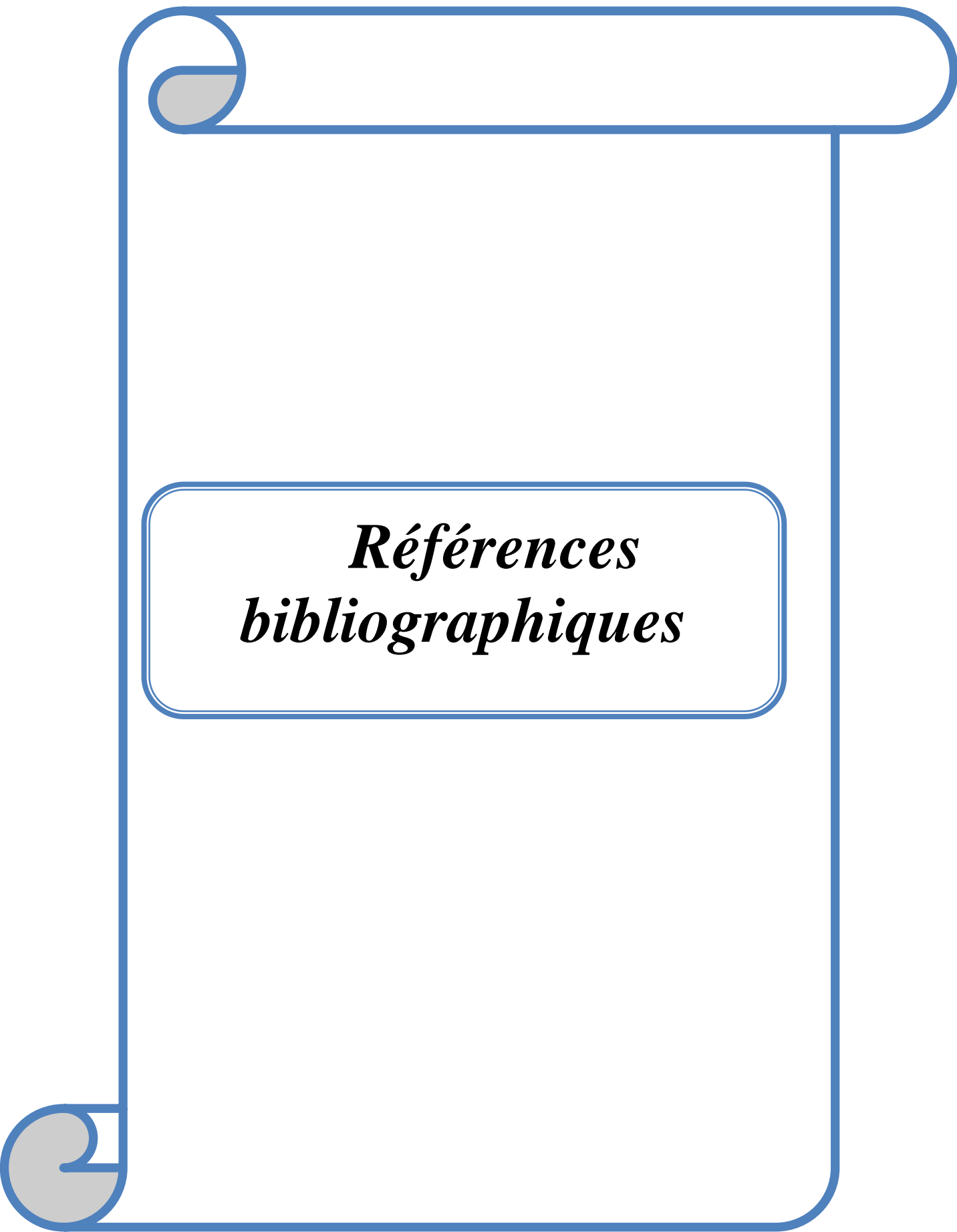
- Tout d'abord, l'extraction de l'HE de la marjolaine sèche par hydrodistillation a donné un rendement très faible en comparant à la bibliographie.
- En ce qui concerne le pouvoir antibactérien par la méthode de la diffusion de disque, toutes les souches de référence testées ont été montrées sensibles à l'HE, avec une activité inhibitrice extrême sur *Staphylococcus aureus*.
- L'huile essentielle extraite d'*Origanum majorana* présente des activités antibactériennes variables sur les 18 souches cliniques Gram négatif testées ; desquelles sont multirésistantes à 37 % ; une activité inhibitrice extrême exercée sur *Escherichia coli* et *Proteus spp*, or *E coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp* ont été apparues très sensibles à l'aromatogramme.
- Quant à la caractérisation de l'effet antibactérien obtenu, en se basant sur le rapport entre la CMB et la CMI calculées, il est démontré que l'huile essentielle de la marjolaine a un effet bactéricide sur toutes les souches testées.
- En ce qui concerne l'étude qualitative de l'activité antifongique, il est évident que l'huile essentielle présente une activité antifongique significative contre les champignons *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

À la suite de ces résultats, il serait donc très intéressant de continuer ce travail sur plusieurs aspects :

- Mener une enquête détaillée sur les fractions de l'huile essentielle démontrant l'activité antibactérienne *in vitro* en vue d'identifier l'espèce chimique ou les

composés responsables de cette activité ainsi que la synergie d'action probable entre eux, ces études devront être confirmées par un suivi *in vivo*.

- Envisager l'étude de l'effet de cette (ces) substance (s) active (s) sur une éventuelle modification du génome bactérien.
- Sachant que le but ultime de ce travail est la valorisation de la plante *Origanum majorana* et la recherche de son intervention dans la phytothérapie humaine, l'évaluation de l'existence d'une éventuelle potentialité génotoxique dans l'huile essentielle issue de cette plante serait nécessaire.



*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

## A

**Aiche-Iratni, G.,( 2016).** Activités biologiques, d'intérêt médical, d'extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* et d'*Origanum majorana*. Doctoral dissertation. Université Mouloud MAMMERI.

**Azzi R. (2013).** Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. Thèse Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid -Tlemcen.

## B

**Baâtour, O., Tarchoun, I., Nasri, N., Kaddour, R., Harrathi, J., Drawi, E., ... & Lachaâl, M. (2012).** Effect of growth stages on phenolics content and antioxidant activities of shoots in sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) varieties under salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 11(99), 16486-16493.

**Bardaweel SK, Hudaib MM, Tawaha KA, Bashatwah RM. (2015).** Studies on the in vitro antiproliferative, antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibition activities associated with *Chrysanthemum coronarium* essential oil. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 790838.

**Barbosa, R., & Frenette, Y. (2019).** À la recherche des passagers du Panola: un épisode de migration française et nord-américaine au Brésil, 1875-1876. *Études canadiennes/Canadian Studies*. Revue interdisciplinaire des études canadiennes en France, (86-2).

**Başer, K. H. C. (2016).** Essential oils of *Achillea* species of Turkey. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 3(1), 1-14.

**Baytop, T.( 1999).** Therapy with medicinal plants in Turkey past and present, 2nd ed. Nobel Tıp Kitabevi, Istanbul

**Beloued, A. (1998).** Medicinal plants of Algeria. Alger: *Office of University Publications*, 62.

**Ben Salha G. (2020).** Déterpénation de l'huile essentielle d'*Origanum Majorana* L. et évaluation des activités biologiques. Thèse Doctorat. Université de Tunis El Manar.

**Benamor B., (2008).** Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principe actifs ; texturation par Détente instantanée Contrôlée (DIC). Thèse de doctorat en génie des procédés Industriels. Université de la Rochelle.

**Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS,( 2009).** Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update From the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases.*;48:1–12

**Bouguerra, N. (2019).** Efficacité comparée des extraits de deux plantes, *Thymus vulgaris* et *Origanum vulgare* à l'égard d'une espèce de moustique, *Culex pipiens*: Composition chimique, Toxicité, Biochimie et Biomarqueurs.

**Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Senhajiskli N., Abrini, J.( 2005).** L'effet antibactérien in vitro de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* vis à vis de souches

d'origine clinique. *Nouvelles Tendances dans l'Ingénierie Biomédicale*, 11: 142-149.

**Bruneton, J., (2004).** *Plantes médicinales*. Paris : Edition Lavoisier, Paris.

**Burt S., (2004).** Huiles essentielles : leurs propriétés antibactériennes et applications potentielles dans les aliments, une revue. *Int. J. Microbiol alimentaire*. 94, 223-253.

**Busatta, C., Vidal, R. S., Popiolski, A. S., Mossi, A. J., Dariva, C., Rodrigues, M. R. A., ... & Cansian, R. L. (2008).** Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food microbiology*, 25(1), 207-211.

## C

**Caillaud, K. (2013).** Vers une gouvernance territoriale de l'environnement ? analyse comparée des politiques départementales de gestion de l'eau destinée à la consommation humaine et des déchets municipaux (Doctoral dissertation, Strasbourg).

**CB N.,(2013).** *Prise En Charge Des Douleurs Articulaires Par Aromathérapie Et Phytothérapie*. [Thèse de doctorat]. Université Toulouse Iii Paul Sabatier, Faculté Des Sciences Pharmaceutiques.

**Chenna, A., Ahmedi, R., & Chefrou, 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).

**Clevenger, J. F. (1928).** Apparatus for the determination of volatile oil. *The Journal of the American Pharmaceutical Association (1912)*, 17(4), 345-349.

**Couplan, F. (2015).** *Le régal végétal : reconnaître et cuisiner les plantes comestibles*. Sang de la terre.

## D

**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*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2576-2581.

**Deuschle, M., Hendlmeier, F., Witt, S., Rietschel, M., Gilles, M., Sánchez-Guijo, A., ... & Hellweg, R. (2018).** Cortisol, cortisone, and BDNF in amniotic fluid in the second trimester of pregnancy: Effect of early life and current maternal stress and socioeconomic status. *Development and Psychopathology*, 30(3), 971-980.

## E

**El-Akhal, F., Guemmouh, R., Greche, H., & El Ouali Lalami, A. (2014).** Valorization as a bio-insecticide of essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* cultivated in center of Morocco. *J. Mater. Environ. Sci*, 5(S1), 2319-2324.

**Ez zoubi Yassine, Farah Abdellah, Rais Chaimae, El Ouali Lalami Abdelhakim (2016).** Antibacterial efficacy of essential oils from three Moroccan plants (*Lavandula officinalis*, *Origanum majorana* and *Thymus vulgaris*) against clinical isolates. *Int. J. Curr. Pharm. l Rev. Res*, 7(6), 360-366.

## F

**Freire-Moran, L., Aronsson, B., Manz, C., Gyssens, I. C., So, A. D., Monnet, D. L., ... & ECDC-EMA working group. (2011).** Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria—Time to react is now. *Drug resistance updates*, 14(2), 118-124.

**Furia, T. E. (1973).** *CRC handbook of food additives* (Vol. 1). CRC press.

## G

**Goel, S., & Vasudeva, A. (2015).** Online Attendance System.

## H

**Hafez, A. A. (2012).** Physico-chemical and sensory properties of cakes supplemented with different concentration of *marjoram*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(13), 463-470.

**Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990.

**Hilan, C., Sfeir, R., Jawish, D., & Aitour, S. (2006).** Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae. *Lebanese Science Journal*, 7(2), 13-22.

## I

**Ietswaart, J. H. (1980).** A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). *Leiden Botanical Series*, 4(1), 1-153.

## K

**Kennedy, H. (2018).** Living with data: Aligning data studies and data activism through a focus on everyday experiences of datafication. *Krisis: Journal for Contemporary Philosophy*, 2018(1), 18-30.

**Kossi Jean Marie D. Tokoudagbai ; Rafiatou Bagabin A. Assanhou Noelie I. Akovobahoui Fernand A. Gbaguidil ; Lamine Said Baba-Moussa . (2024) .** Cytotoxicite *in vitro* et activité antibacterienne des fractions de l'extrait hydro-ethanolique de *Abrus precatorius* (Fabaceae). *Journal de la Société de Biologie Clinique du Bénin* .VOL: 045.

**Krishnakumar, B., Subash, B., & Swaminathan, M. (2012).** AgBr<sup>-</sup>ZnO<sup>-</sup> An efficient nano-photocatalyst for the mineralization of Acid Black 1 with UV light. *Separation and Purification Technology*, 85, 35-44.

## L

**Lagunez Rivera, L., (2006).** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes

matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. France.

## M

**Mahfouf, N. (2018).** *Étude de l'espèce Origanum vulgare L* (Doctoral dissertation, Université Chadli Benjedid-El Tarf (Algérie)).

**Marlène Amara, Guillaume Aubin, François Caron, Vincent Cattoir, Laurentdortet, Sylvaingoutelle, Katy Jeannot, Raphaël Lepeule, Gérard Lina, Hélène Marchandin, Audrey Mérens, Marie-Cécile Ploy, Frédéric Schramm, Emmanuelle Varon, (2022).** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, vol :1.

**Miller, J. M., Homan, J., & Miniutti, G. (2006).** A Prominent Accretion Disk in the Low-Hard State of the Black Hole Candidate SWIFT J1753. 5–0127. *The Astrophysical Journal*, 652(2), L113.

**Moghaddam, A. H., Moghaddam, M. H., & Esfandyari, M. (2016).** Stock market index prediction using artificial neural network. *Journal of Economics, Finance and Administrative Science*, 21(41), 89-93.

**Mohamed N., Yasmen S. H. & Nohir G. (2011).** Antimicrobial activity of water and ethanol Majoram (*Origanum majorana* L) extract, *The 6th Arab and 3rd International Annual Scientific Conference*, 2350-2366.

**Muthanna, J M., Utpal, A., Ammar, B A., Vijay, T., Yigong, G., Anubhav, P., (2021).** Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and Antibacterial Activity of White Wormwood *Artemisia herba-alba*, 16;10(1):164.

## N

**Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S. M., & Ghorbani, A. (2005).** *Labiatae* family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 4(2), 63-79.

**Ndife, J., Uka, N. C., & Ukom, N. A. (2019).** Development and comparative evaluation of green and black tisanes using scent leaves (*Chromolaena odorata*). *Food Research*, 3(5), 448-455.

## O

**Ouibibete, Z., & Slimani, M. (2023).** *L'effet d'une plante médicinale" Artémisia herba-alba" sur les paramètres sanguins* (Doctoral dissertation, Université Mouloud MAMMERY).

**OULD AMER Imane, (2024).** Effet de l'ail « *Allium sativum* L. » sur la flore buccale. Thèse de Doctorat. Univ : Ibn Khaldoun de Tiaret.

## P

**Prerna, P., & Vasudeva, N. (2015).** *Origanum majorana* L.-Phyto-pharmacological review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 6(4), 261-267

## R

**Rezzoug Hamida, BouchenakOuahiba, Boudjema Khaled, Benabdelkader Tarek, Tomi Felix, Tomi Pierre & Djilani Selma , (2024).** A novel anti-candidiasis cream formulation based on *Melissa officinalis* and *Lavandula stoechas* essential oils synergism. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, vol:33.

**Rokosuieva G.A. (2015).** Les soins par les plantes médicinales et la science des astres. *Éditions Ambre* .B.P.13 .Le Touvet Cedex .

## S

**Sahraoui, N., Larbi, R., Lakhdari, M., Errahmani, M. B., Guetarni, D., & Hornick, J. L. (2016).** Impact d'un extrait végétal «*Origanum majorana*» sur les paramètres zootechniques et l'état de santé du poulet de chair. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 4(3).

**Salha, G. B., Díaz, R. H., Labidi, J., & Abderrabba, M. (2017).** Deterpenation of *Origanum majorana* L. essential oil by reduced pressure steam distillation. *Industrial crops and products*, 109, 116-122.

**Samirr, Hameurlaine, (2009).** Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *Pituranthos scoparius* et *Rhantherium adpressum* de la région de Ghardaïa.

**Sefsaf Hafidha,(2016)** .Etude de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle et des extraits de l'espèce *Origanum majorana* L . Univ. SAAD DAHLAB DE BLIDA.

**Singh, S., Pandey, S. K., Pawar, U., & Janghel, R. R. (2018).** Classification of ECG arrhythmia using recurrent neural networks. *Procedia computer science*, 132, 1290-1297.

**Skoula, M., & Harborne, J. B. (2002).** The taxonomy and chemistry of *Origanum*. *Oregano: the genera Origanum and Lippia*, 67.

**Snježana Hodžić , Amela Hercegovac Aldijana Avdić , Nijaz Tihic , Darja Husejnagić , Merima Ibišević and Melisa Kadrić ,(2021).** Antimicrobial Activity of Antibiotics, Oregano and Thyme Essential Oils against Extended Spectrum Beta Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates . *Journal of Advances in Microbiology*.VOL 21(12): 112-119

## T

**Tasneem Sultan Abu Ghazal, Zsuzsanna Schelz, Livia Vidács Nikoletta ,Szemerédi Katalin Veres, Gabriella Spengler ,Judit Hohmann,(2022).** Antimicrobial, Multidrug Resistance Reversal and Biofilm Formation Inhibitory Effect of *Origanum majorana* Extracts, Essential Oil and Monoterpenes *Journal of Plants* , 11(11), 1432.

**TOURE Daouda.M,( 2015).** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire. (Thèse Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur), Université Félix HOUPHOUËT- BOIGNY. 116p.

## V

**Vági, E., Simándi, B., Suhajda, A., & Hethelyi, E. (2005).** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and

supercritical carbon dioxide. *Food research international*, 38(1), 51-57.

## W

**Williams D. G., (1997).** La chimie des huiles essentielles. Presse Micelle. Angleterre.

## Z

**Zakya M'hamdi , Aziz Bouymajane , Ouassima Riffi , Fouzia RhaziFilali , Mostafa Etrchouch , Mohammed ELhourri , Ali Amechrouq ,(2024)** .Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pelargonium graveolens* and its fractions.*Arabian Journal of Chemistry*.Vol:17.

**Zeković, Z.P., Lepojević, T.D., Mujić, I.O., (2009).** Laurel Extracts Obtained by Steam Distillation, Supercritical Fluid and Solvent Extraction. *Journal Nat. Prod.* 2, 104–109.

**ZERROUK M. (2019).** Mise en valeur des huiles essentielles des plantes aromatiques Algériennes (*Schinus molle*). (Thèse de Doctorat), Université Kasdi Merbah – Ouargla.127p



***Annexes***

## Annexe 1

La Mc Ferland standard 0.5 est une solution utilisée lors de la préparation des inocula bactériens. Il se prépare en mélangeant 99.5ml d'Acide Sulfurique (0.18M) et 0.5ml de Chlorure de baryum (0.048 M) dans des tubes identiques aux tubes utilisés pour la préparation de l'inoculum. Il faut le stocker dans l'obscurité à une température de 22°C à 25°C. Après la préparation de la solution, on doit vérifier l'exactitude de la densité de Mc Ferland par le spectrophotomètre à longueur d'onde de 625nm qui devrait être compris entre 0.08 et 0.13. Avant chaque utilisation, agiter le tube pour mélanger la fine précipitée blanche de Sulfate de Baryum.

## Annexe 2

Gélose de Muller Hinton est une gélose standardisée pour les tests de sensibilité aux antibiotiques et sulfamides. Pour la préparation de la gélose de Muller Hinton, on a besoin de 38g de la poudre du Muller Hinton Agar. Les étapes de préparation sont :

1. Dans un bécher, en dissolvant la poudre dans un litre de l'eau distillé, il faut l'homogénéiser et chauffer en agitant ;
2. Porter à ébullition environ une minute ;
3. Mettre dans des flacons en verre bien fermés pour le stériliser à l'autoclave pendant 15min à 121.1°C. Pour l'utiliser, laisser refroidir, puis le couler dans des boites de pétri (25ml par boite) dans un milieu stérile et laisser reposer. Ils sont prêts à l'utilisation immédiatement ou stocker à 2°C à 8°C pendant une semaine au plus.



**Figure 1:** Préparation de la gélose Muller Hinton

### Annexe 3

Gélose nutritive (GN) : environnement de conservation et d'isolement non sélectif : la poudre a été suspendue dans 1 litre d'eau distillée. Le mélange doit être chauffé à ébullition afin de dissoudre complètement le milieu à l'aide d'un tamis.

En utilisant un agitateur, le mélange a été réparti en tubes et stérilisé pendant 15 minutes. Une fois refroidie à une température de 45-50 °C, la GN a été versée dans des boîtes de pétri (jusqu'à ce qu'elle se solidifie) et conservée au réfrigérateur à une température de 2°C.



**Figure 2:** Préparation de la gélose nutritive.

#### Annexe 4

Bouillon nutritif : 28 grammes de milieu (BN) déshydraté ont été pesés pour 1 litre d'eau distillée et le contenu. Chauffer jusqu'à ce que le milieu soit complètement dissous à l'aide d'un agitateur. Une fois que le mélange a été homogénéisé, nous l'avons stérilisé à l'autoclave à une température de 121 °C pendant 20 minutes. Laisser refroidir pendant quelques minutes dans le cône stérile du bec Bunsen. Quand la préparation a commencé. Le bouillon nutritif a été versé dans les tubes à une température inférieure à 60 °C.

Étant donné que chaque 10 ml est placé dans un tube et conservé au réfrigérateur à une température de 2-8 °C.

#### Annexe 5

Préparation de l'eau physiologique : On a pesé 2.7 grammes de poudre (NaCl) et on la mise dans 0.3 litre d'eau distillée, puis on a homogénéisé et chauffé le mélange en agitant, on a réparti le mélange en tubes ou flacons stériles, ensuite on a stérilisé les tubes à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes, laissant refroidir puis conserver au réfrigérateur à 2-8 °C.



**Figure 3:** Préparation de l'eau physiologique

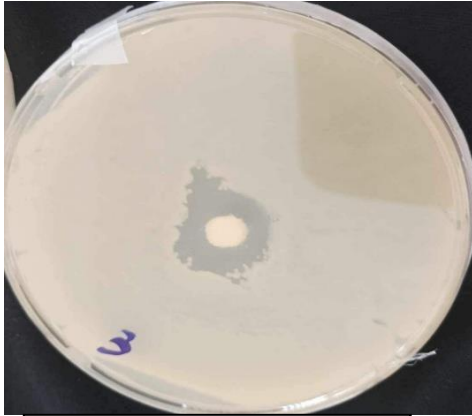
#### Annexe 6

Préparation de PDA :

- Prendre 39 gr de PDA de synthèse.
- Le mélanger à 1 l d'eau distillée.
- Secouer doucement jusqu'à obtenir un mélange homogène.
- Auto-claver sous une pression de 1,4 bar à la température de 125°C durant 15 minutes.
- Laisser refroidir un peu sous la hotte, puis couler la solution sur les boîtes de Pétri.
- Laisser sécher pendant 24 à 48 heures.

## Annexe 7

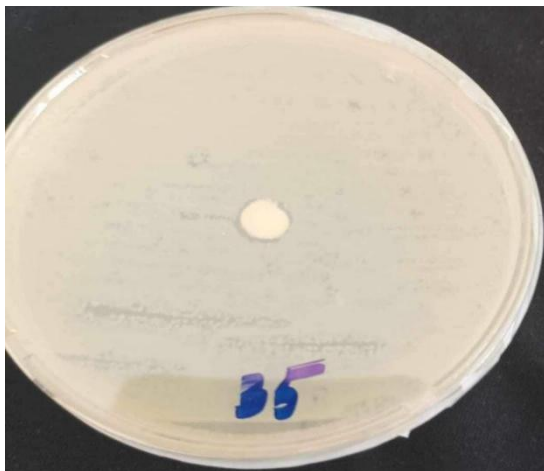
Les figures suivantes montrant les zones d'inhibition induite par l'HE d'*Origanum majorana* L contre les souches bactériennes cliniques testées.



*Escherichia coli* 03



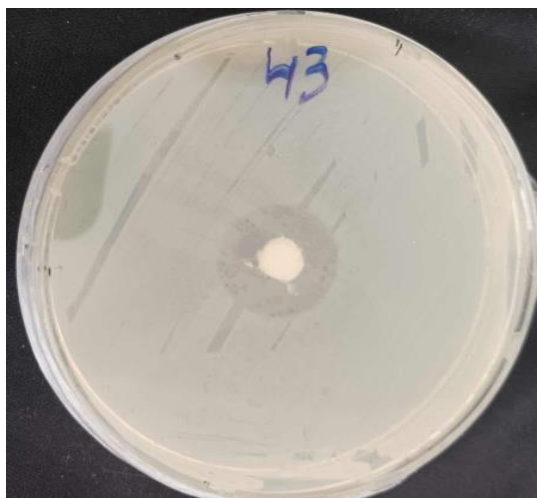
*Escherichia coli* 04



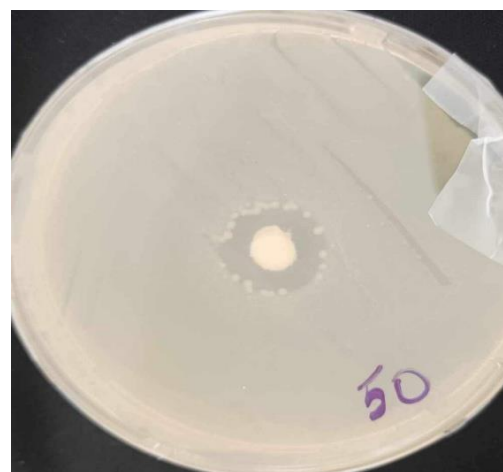
*Escherichia coli* 10



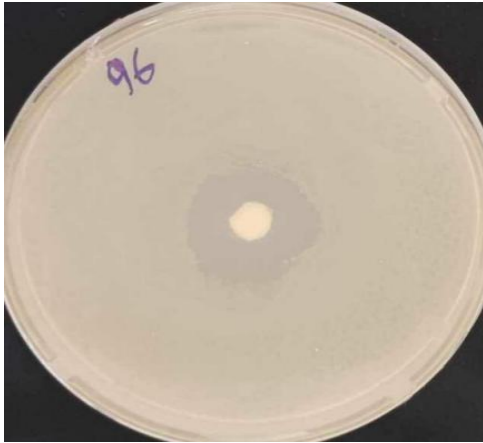
*Proteus spp* 01



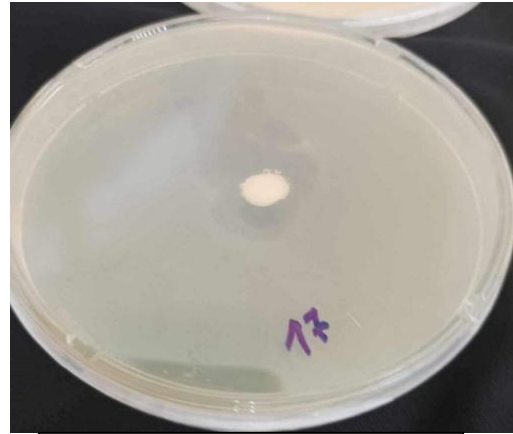
*Escherichia coli* 08



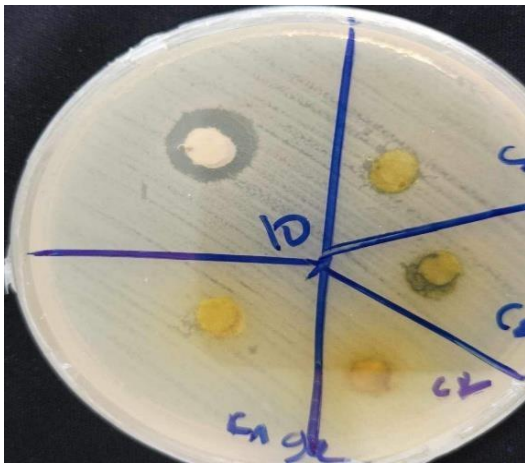
*Klebsiella pneumoniae* 03



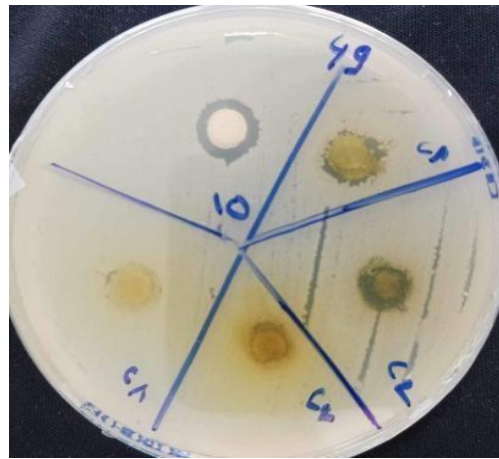
*Proteus spp 03*



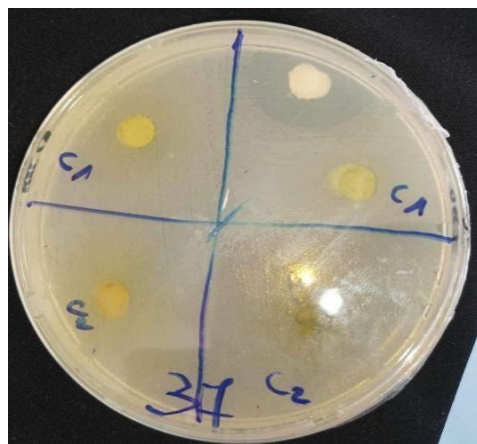
*Pseudomonas aeruginosa*



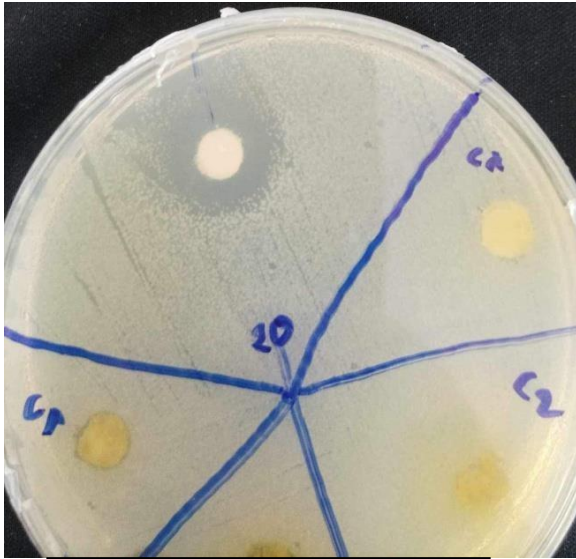
*Proteus spp 02*



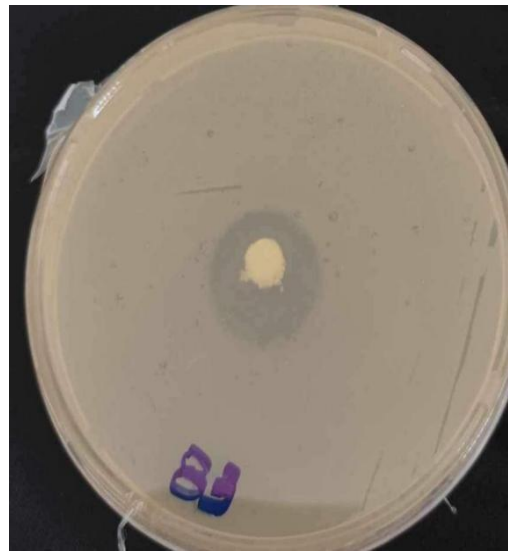
*Escherichia coli 09*



*Escherichia coli 07*



*Escherichia coli* 06



*Enterobacter* spp

**Figure 4:** Zones d'inhibition induites par l'HE d'*Origanum majorana* L contre les souches bactériennes testées.