

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 أوت 1955 - سكيكدة
UNIVERSITE 20 AOÛT 1955-SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Intitulé

Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle *d'origanum vulgare*

Présenté Par: - Bouhadjar Rania
- Lahmanes Kaoutar
- Ellassassa Ines
- Bourrich Zine El Abidine

Membres de Jury:

ENNAGHRA Nadjat	MCA	Présidente	Univ.20 août 1955-Skikda
DJERRAB Leila	MCB	promotrice	Univ. 20 août 1955-Skikda
MELLOUKA Hadda	MCB	Examinatrice	Université 20 août 1955-Skikda

Année universitaire 2024/2025

Remerciements

*Nous voudrions profiter cette occasion pour exprimer nos sincères remerciements et notre reconnaissance à:
Dieu, le tout puissant pour nous donner la force, la santé et la patience pour accomplir ce modeste travail.*

Notre directeur de recherche, Dr. Djerrab Leila , non seulement pour avoir pris soin de nous, mais surtout pour nous donner de précieux conseils, ainsi il nous a dirigé tout au long de la préparation du mémoire de master

les membres du jury Dr Ennaghra Nadjet autant que présidente et Dr Mellouka autant qu'examinatrice pour le temps que vous avez consacré à la lecture de notre mémoire de fin étude s'achez vous que nous sommes très honoré que vous ayez accepté de faire partie de ce jury afin d'évaluée notre modeste travail

Nous vous remercie vivement

Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance et notre sincère gratitude à tous les enseignants de la filière de biologie de l'université de Skikda , sans exceptions, pour les efforts qu'ils ont fournis durant ces cinq années de formation.

Nous exprimons nos vifs remerciements à toute l'équipe de laboratoire de Microbiologie pour leur aide précieuse durant la réalisation de notre travail.

Finalement, il nous est agréable d'adresser nos remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et qui ont marqué mon parcours universitaire et personnel.

Dieu Tout-Puissant

*Source de toute sagesse et de toute force,
Merci pour Ta grâce infinie qui m'a guidé à chaque étape de ce parcours.
C'est par Ta volonté que j'ai pu mener à bien ce travail.*

À ma tendre maman

*Mon ange gardien, ma première enseignante,
Tes prières silencieuses ont été mon bouclier,
Tes sacrifices, le socle de ma réussite.
Ce mémoire est le fruit de ton amour inconditionnel.*

Ma douce sœur Amani

*Ma complice de toujours, mon rayon de soleil,
Tes encouragements ont dissipé mes doutes,
Ton sourire a illuminé mes journées de labeur.
Cette victoire est aussi la tienne.*

Ma chère famille

*Votre soutien indéfectible a été mon moteur,
Vos valeurs, ma boussole.
Merci d'avoir cru en moi quand je perdais confiance.*

À mes professeurs et encadrants pour vos précieux conseils, votre patience et votre transmission de savoir, qui ont guidé mes pas tout au long de ce travail.

À mes amis, pour votre présence, votre motivation et les moments de partage qui ont rendu ce parcours plus léger et enrichissant.

À tous ceux qui croient en la science et en la nature pour leur rappeler que les solutions aux défis sanitaires peuvent aussi venir des trésors que nous offre la Terre.

Enfin, à moi-même pour la persévérance, les efforts et les nuits passées à poursuivre cet objectif. Ce mémoire est le fruit d'un long chemin, et j'en suis fier.

Derrière chaque réussite, il y a une mère qui a prié, une sœur qui a encouragé, et un cœur qui a cru.

Rania

Dédicace

Avec humilité et gratitude, je rends grâce à Dieu, en premier et en dernier, louange digne de Sa majesté et de la grandeur de Ses dons, pour Ses innombrables bénédictions, pour Sa miséricorde qui m'a enveloppée dans mes moments de faiblesse, et pour la force qu'Il a déposée dans mon cœur lorsque je croyais ne plus pouvoir continuer. Sans Sa volonté, je ne serais pas en train d'écrire ces mots aujourd'hui.

À mes chers parents, première source d'amour et de générosité, merci pour vos prières qui ont été mon bouclier, pour votre patience et votre foi en moi, même lorsque moi-même je doutais de mes capacités. Vous êtes la sécurité de ma vie et la raison de mon existence. Aucune parole ne saurait suffire pour vous rendre ce que vous m'avez donné.

À ma famille, ce refuge chaleureux vers lequel je reviens, peu importe où les jours me mènent, merci pour chaque moment de soutien, pour chaque mot bienveillant, et pour tout cet amour sincère que vous m'avez offert sans condition.

À mon amie précieuse Ikram, merci pour ta loyauté, ta présence constante dans ma vie, et pour tous les souvenirs que nous avons partagés. Tu as été une sœur, un pilier, une lumière inextinguible dans mon cœur.

Et à la lune qui habite mon cœur, mon amie Qamar, merci pour ton rire qui a été un baume, pour ta présence apaisante qui m'a soulagée bien des fois. Pour chaque instant merveilleux vécu ensemble, je t'adresse tout mon amour et ma reconnaissance.

Enfin, à tous ceux qui m'ont aimée sincèrement, à ceux qui ne m'ont pas abandonnée dans mes moments de faiblesse, qui m'ont écoutée quand j'avais besoin d'une oreille attentive, qui m'ont offert la chaleur des mots au cœur du froid de la solitude... merci d'avoir été une part de ma réussite.

Vous avez tous gravé vos noms dans mon cœur, et vous avez été parmi les plus belles bénédictions sur mon chemin.

Kaoutar

Dédicace

À mon père « El Assassa amer »

À ton âme pure, si tendre et si vivante, Toi qui n'as jamais ménagé tes efforts ni tes nuits pour moi, Toi qui as lutté pour mon bien-être et mes études, Ta présence était mon refuge et ma chaleur, et ton absence est une douleur profonde qui ne quitte jamais mon cœur. Comme j'aurais aimé que tu sois là aujourd'hui pour voir le fruit de tes années de labeur, Pour voir mon succès et mon sourire, Pour voir la réussite de ta fille chérie et en être fier. Comme j'ai rêvé de partager cette joie avec toi, D'entendre tes douces paroles, Et de voir la fierté briller dans tes yeux, Tu as été mon soutien et ma force, Et tu resteras dans mon cœur et dans chaque pas que je ferai. Je souhaite que tu sois fier de moi. Je t'aime. Je prie Allah qu'Il te fasse miséricorde et te donne le Paradis pour demeure.

À ma chère maman

Source de tendresse et cœur généreux, Toi qui m'as portée avec tant d'amour et de patience, Et m'as offert un soutien et des encouragements sans limites, Tu es mon havre de paix et ma chaleur en toutes circonstances. Merci pour chaque instant passé à mes côtés, Pour chaque prière que tu as murmurée pour moi. Sans toi, ce succès n'aurait aucun sens. Je suis si fière de toi et de ta présence dans ma vie.

À mon frère et ma sœur

Compagnons de ma vie et soutiens de tous les jours, Merci pour chaque mot d'encouragement, chaque sourire sincère, Pour chaque moment où vous avez été là pour moi. Vous faites partie de ce succès, Et vous êtes la source de joie qui remplit mon cœur. Je vous offre tout mon amour et ma gratitude.

Je dédie ce succès à moi-même, fruit d'un travail et d'efforts continus durant toutes ces années.

Ines

Dédicace

Avant tout alhamdlilallah le tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, et de m'avoir aidé à réaliser Ce modeste travail que je dédie :

À mon père, qui m'a toujours encouragé à poursuivre mes rêves. Ce travail est le fruit de votre confiance et de votre patience.

Merci pour tout.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, celle qui m'a transmis le courage et l'amour, pour sa tendresse et pour ses encouragements durant mon parcours, à ma très chère Maman que j'adore.

À ma femme, Bouzid Fouzia , mon roc, mon inspiration. Merci pour ton amour, ta patience et ton soutien inébranlable tout au long de ce parcours. Ce mémoire est aussi le vôtre

À mes chers enfants Siradj, Sadjed et Belsem qui ont été une raison supplémentaire de la difficulté de terminer ce travail

A tout la promotion 2024. Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.

Zine El abidine

Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Introduction générale	01
Chapitre1 : synthèse bibliographique	
I.1. Huiles essentielles	02
I.1.1. Historique	02
I.1.2. Définition des huiles essentielles	03
I.1.3. Origine et localisation des huiles essentielles	03
I.1.4. Methodes d'extractions des huiles essentielles	03
I.1.4.1 Hydro-distillation	03
I.1.4.2 Distillation par entraînement à la vapeur d'eau	03
I.1.4.3 Extraction assistée par micro-ondes	04
I.1.4.4 Extraction par hydro-diffusion	04
I.1.5. Composition chimique des huiles essentielles	04
I.1.5.1 Composés terpéniques	04
I.1.5.2 Composés aromatiques dérivés du phénylpropane	05
I.2. Les espèces végétales	06
I.2.1. Description botanique <i>L'Origanum vulgare</i>	06
I.2.2. Taxonomie <i>d'Origanum vulgare</i>	07
I.2.3. Distribution géographique	08
I.2.3.1 Distribution géographique dans le monde	08
I.2.3.2. Distribution géographique dans l'algerie	08
I.3. Généralités sur les souches étudiées	08
I.3.1. <i>Escherichia coli</i>	08
I.3.1.1. Classification	08
I.3.1.2 Pouvoir pathogène	09
I.3.1.3. Résistance aux antibiotiques	09
I.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	09

I.3.2.1. Classification	09
I.3.2.2. Pouvoir pathogène	09
I.3.2.3. Résistance aux antibiotiques	09
I.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	09
I.3.3.1. Classification	10
I.3.3.2. Pouvoir pathogène	10
I.3.3.3. Résistance aux antibiotiques	10
I.3.4. <i>Bacillus subtilis</i>	10
I.3.4.1. Classification	11
I.3.4.2. Pouvoir pathogène	11
I.3.4.3 Résistance aux antibiotiques	11
I.3.5. <i>Candida albicans</i>	11
I.3.5.1. Classification	12
I.3.5.2. Pouvoir pathogène	13
I.3.5.3. Résistance aux antifongiques	13

Chapitre 2 : Matériel et méthode

II.1. Cadre général de l'étude	14
II.1.1. L'objectif de l'étude	14
II.2. Matériel utilisé	14
II.2.1. Matériel non biologique	14
II.2.2. Matériel biologique	15
II.2.2.1. Matériel végétal	15
II.2.2.2. Microorganismes testés	16
II.3. Protocole d'extraction des huiles essentielles	16
II.3.1. Préparation de la matière végétale.....	16
II.3.2. Hydrodistillation.....	16
II.3.3. Calcul du rendement	18
II.4. Évaluation de l'activité anti microbienne	19
II.4.1. Revivication et repiquage des souches bactériennes	19
II.4.1.1. Identification des souches bactérienne	19
II.4.1.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	23
II.4.1.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	24
II.4.1.4. Détermination de la CMB à partir de la méthode de macrodilution	25

Chapitre 3 : Résultats et discussions

III .1. Rendement d'extraction et caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle	26
III .2. Identifications des souches bactériennes	27
III.3. L'activité antibactérienne	30
III.3.1. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	31
III.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 1117.....	32
III.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	32
III.3.4. <i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	32
III.3.5. <i>Candida albicans</i>	32
III.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle	32
Conclusion générale	35
Liste des références.....	36

Liste des abréviations

CMI : la concentration minimale inhibitrice

CMB: la concentration minimale bactéricide

CPG: chromatographie en phase gazeuse

E.coli: . *Escherichia coli*

EPSP: Établissement public de santé de proximité

KG : kilogramme

MHE: La masse d'huile essentielle en g

MS : La masse de la matière végétale utilisé en g

Mg: milligramme

ML : millilitres

MH: mueller_hinton

Sm: spectrométrie de masse

UL: microlitre

Liste des figures

Figure 01 : Dessin d' <i>Origanum vulgare</i>	06
Figure 02 : Distribution du genre <i>Origanum vulgare</i> au monde.....	08
Figure 03 : <i>Origanum vulgare</i> medicinal herb from Algeria	15
Figure 04 : situation géographique du Ain Bouziane	16
Figure 05 : <i>Origanum vulgare</i> (A) avant séchage ,(B) après séchage	16
Figure 06 : méthode d'hydrodistillation	18
Figure 07 : les dilutions d'HE.....	21
Figure 08 : Mueller Hinton dans les boites de Pétri	21
Figure 09 : ensemencement des bactéries.....	22
Figure 10 : application des disque	22
Figure 11 : préparation des dilutions	24
Figure 12 : préparation de l'inoculum bactérienne	24
Figure 13 : Les résultats de l'aromatogramme in vitro de l'HE de <i>d'Origanum vulgare</i>	26

Liste des tableaux

Tableau 01 : Taxonomie de la <i>vulgare</i>	07
Tableau 02 : Caractéristiques des souches microbiennes utilisées dans l'étude.....	17
Tableau 03 : Rendement d'extraction et Caractéristiques organoleptiques de l'HE <i>d'Origanum vulgare</i>	26
Tableau 04 : Résultats des observations macroscopique des souches bactériennes	27
Tableau 05 : Résultats des observations microscopique des souches bactériennes	29
Tableau06 : Les diamètres des zones d'inhibitions selon la dilution de l'huile essentielle <i>d'Origanum vulgare</i>	31
Tableau 07 : Résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle <i>d'Origanum vulgare</i> contre les souches testées.....	33
Tableau08 : Les résultats de CMB de l'huile essentielle de <i>d'Origanum vulgare</i>	33

Résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*. L'huile a été obtenue par hydrodistillation, avec un rendement de 0,89 %. L'évaluation biologique a porté sur cinq souches de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1117, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 et la levure *Candida albicans*. Les tests ont été réalisés par diffusion sur disques, complétés par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricide/fongicide (CMB). Les résultats ont révélé une activité variable selon les souches testées. Les plus grandes zones d'inhibition ont été enregistrées pour *Escherichia. Coli* et *Candida. albicans* (26 mm), suivies de *Bacillus. spizizenii* (21 mm) et *Staphylococcus. Aureus* (20 mm). En revanche, *Pseudomonas. aeruginosaa* montrés un faible halo d'inhibition (3 mm), traduisant une résistance partielle. Les CMI les plus faibles (2,5 mg/mL) ont été observées pour *Escherichia. Coli*, *Staphylococcus .Aureus*, *Bacillus. spizizenii* et *Pseudomonas. aeruginosa*, tandis que *Candida .albicans* a nécessité 5 mg/mL. L'effet bactéricide ou fongicide a été confirmé pour l'ensemble des souches, à l'exception de *Staphylococcus. Aureus*, pour laquelle seul un effet inhibiteur a été observé (CMB > 5 mg/mL). Ces résultats prometteurs suggèrent que l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* pourrait représenter une alternative naturelle intéressante.

Mots-clés : *Origanum vulgare* ; huile essentielle ; activité antimicrobienne ; *Candida albicans* ; hydrodistillation ; alternatives naturelles.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil of *Origanum vulgare*. The oil was obtained by hydrodistillation, with a yield of 0.89%. Biological evaluation focused on five reference strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichiacoli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1117, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, and the yeast *Candida albicans* ATCC. Tests were conducted using the disk diffusion method, complemented by determining minimum inhibitory concentrations (CMI) and minimum bactericidal/fungicidal concentrations (CMB). The results revealed variable activity depending on the tested strains. The largest inhibition zones were recorded for *E. coli* and *C. albicans* (26 mm), followed by *B. spizizenii* (21 mm) and *S. aureus* (20 mm). In contrast, *P. aeruginosa* showed a weak inhibition halo (3 mm), indicating partial resistance. The lowest CMIs (2.5 mg/mL) were observed for *E. coli*, *S. aureus*, *B. spizizenii*, and *P. aeruginosa*, while *C. albicans* required 5 mg/mL. A bactericidal or fungicidal effect was confirmed for all strains, except *S. aureus*, for which only an inhibitory effect was observed (CMB > 5 mg/mL). These promising results suggest that *Origanum vulgare* essential oil could represent an interesting natural alternative.

Keywords: *Origanum vulgare*, essential oil, antibacterial activities, *Candida albicans*, hydrodistillation, natural alternative.

ملخص

كان هدف هذه الدراسة تقييم النشاط المضاد للميكروبات لزيت الزعتر العطري (*Origanum vulgare*) تم الحصول على الزيت بواسطة التقطير المائي، بنسبة مردود بلغت 0.89%. شملت التقييمات البيولوجية خمس سلالات مرجعية : *Pseudomonas aeruginosa* ، *Escherichiacoli* (ATCC 25922) ، *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923) (ATCC 1117) ، *Bacillus spizizenii* (ATCC 6633) ، والخميرة *Candidaalbicans* (ATCC). أجريت الاختبارات بطريقة النشر على الأقراص، مدعومة بتحديد التركيز الأدنى المثبط (CMI) والتركيز الأدنى القاتل للبكتيريا أو الفطريات (CMB). أظهرت النتائج نشاطاً متبايناً حسب السلالات المختبرة. سُجّلت أكبر مناطق التثبيط ضد *Escherichia Coli* و *Candida albicans* (26 مم) ، تلتها *B. spizizenii* (21 مم) و *S. aureus* (20 مم). في المقابل، أظهرت *P. aeruginosa* حالة تثبيط ضعيفة (3 مم)، مما يشير إلى مقاومة جزئية. لوحظت أقل تراكيز مثبّطة (2.5 ملغ/مل) ضد *E. Coli* ، *S. aureus* ، *B. spizizenii* ، و *P. aeruginosa* ، في حين احتاجت *C. albicans* إلى تركيز 5 ملغ/مل. تم تأكيد التأثير القاتل للبكتيريا أو الفطريات لجميع السلالات، باستثناء *S. Aureus* ، حيث لوحظ فقط تأثير مثبط ($CMB > 5$) ملغ/مل. (تشير هذه النتائج الواعدة إلى أن زيت الزعتر العطري قد يمثل بديلاً طبيعياً واعدًا

الكلمات المفتاحية: الزعتر البري، الزيت العطري، الأنشطة المضادة للبكتيريا، (*Candidaalbicans*) ، الاستخلاص بالتقطير المائي، بديل طبيعي

Introduction générale



Introduction générale

L'émergence et la propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques conventionnels représentent aujourd'hui un défi majeur pour les systèmes de santé publique à l'échelle mondiale. Cette situation alarmante exige le développement de stratégies alternatives, notamment l'exploration de substances naturelles dotées d'activités antimicrobiennes. Parmi ces alternatives prometteuses figurent les huiles essentielles extraites de plantes médicinales, qui suscitent un intérêt croissant grâce à leur richesse en composés bioactifs aux propriétés thérapeutiques.

Depuis des millénaires, les plantes occupent une place centrale dans les systèmes de médecine traditionnelle à travers le monde. Selon **(Lhuillier ,2007)**, leur usage constitue la forme la plus ancienne de médecine connue de l'humanité. Des systèmes médicaux tels que l'ayurvéda en Inde, la médecine traditionnelle chinoise ou encore l'herboristerie pratiquée en Afrique et en Europe illustrent cette richesse thérapeutique ancestrale **(Maurice, 1997)**. Ces savoirs empiriques, transmis de génération en génération **(Khiredine, 2013)**, ont inspiré de nombreuses avancées de la médecine moderne **(Boumediou&Addoun, 2017)**.

Les vertus thérapeutiques des plantes sont principalement attribuées à leurs métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, alcaloïdes, tannins, saponines et huiles essentielles. Contrairement aux métabolites primaires impliqués dans la croissance de la plante, les métabolites secondaires remplissent des fonctions de défense contre les agents pathogènes, les prédateurs ou la concurrence végétale **(Sebai&Boudali, 2012)**.

Parmi les plantes aromatiques d'intérêt, *Origanum vulgare* se distingue par sa forte teneur en composés phénoliques, notamment le carvacrol et le thymol, reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes puissantes. Utilisée depuis l'Antiquité pour traiter diverses affections, cette plante de la famille des Lamiacées attire aujourd'hui l'attention de la communauté scientifique pour son potentiel à remplacer ou renforcer les antibiotiques classiques.

Le présent travail s'inscrit dans cette démarche et vise à évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*. Pour ce faire, notre étude est structurée comme suit :

- Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique sur les huiles essentielles, leurs propriétés et les différentes techniques d'extraction.
- Le deuxième chapitre décrit le matériel utilisé et les méthodes expérimentales appliquées pour tester l'efficacité de l'huile essentielle d'origan contre certaines souches bactériennes.
- Le dernier chapitre est consacré à l'analyse, l'interprétation et la discussion des résultats obtenus.

Chapitre 1 :

Synthèse

bibliographique



Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1. Huiles essentielles

I.1.1. Historique

Il apparaît ainsi que les huiles essentielles accompagnent l'histoire de la civilisation humaine depuis ses origines. Les Égyptiens, puis les Grecs et les Romains, utilisaient diverses matières végétales et leurs extraits, notamment les huiles essentielles, dans des domaines variés tels que la médecine, la parfumerie, les rituels religieux et les traditions spirituelles (**Lawless, 1995**). La période byzantine a marqué une étape importante dans le développement des techniques de distillation, qui furent ensuite perfectionnées durant l'ère arabo-musulmane, notamment grâce aux apports de savants comme Al-Razi et Ibn Sina (Avicenne), qui ont contribué à la médecine et à la chimie des substances naturelles (**Leclerc, 1877 ; Touwaide, 2007**). À cette époque, les huiles essentielles sont devenues des produits clés du commerce international, avec l'Iran et la Syrie comme centres majeurs de production d'extraits aromatiques (**Franchomme&Pénoël, 2001**).

C'est vers l'an 1000 qu'Avicenne, célèbre médecin et savant persan, a mis au point de manière rigoureuse la méthode de distillation par vapeur d'eau, encore largement utilisée aujourd'hui (**Leclerc, 1877**). Cette avancée technique a permis d'extraire les principes actifs volatils des plantes avec une plus grande efficacité et pureté.

Au fil des siècles, les progrès scientifiques ont permis d'approfondir les connaissances sur la composition chimique des huiles essentielles grâce à des méthodes d'extraction et d'analyse de plus en plus performantes, telles que la chromatographie en phase gazeuse. Leur usage thérapeutique s'est également enrichi avec la naissance de l'aromathérapie, discipline initiée en 1928 par René-Maurice Gattefossé, qui fut le premier à employer ce terme après avoir observé les effets cicatrisants de la lavande sur une brûlure (**Gattefossé, 1937**). Ses recherches pionnières ont ouvert la voie à de nombreuses études scientifiques sur les propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et relaxantes des huiles essentielles (**Besombes, 2008 ,Buckle, 2015**).

I.1.2. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs) sont définies comme des liquides complexes, hautement concentrés, volatils et hydrophobes, extraits de différentes parties de plantes aromatiques. Leur appellation d'« huile » provient de leur solubilité dans les corps gras, bien qu'elles ne soient pas des corps gras au sens biochimique du terme. En général, leur densité est inférieure à 1, à l'exception notable de certaines huiles telles que celles du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), de la

Chapitre I : synthèse bibliographique

cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) et du sassafras (*Sassafras albidum*) (Charpentier et al., 2008).

Le terme « essentielle » fait référence au parfum ou à l'arôme caractéristique dégagé par la plante dont elle est issue, souvent considéré comme l'« essence » de la plante (Teuscher et al., 2005). D'un point de vue normatif, l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2000) définit les huiles essentielles comme des substances volatiles obtenues par distillation à la vapeur d'eau ou à l'eau de matériaux végétaux, ou encore par des procédés mécaniques appropriés, comme dans le cas des essences de citrus extraites par pression à froid, suivies d'une séparation de la phase aqueuse.

I.1.3. Origine et localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires produits par les plantes. Leur biosynthèse est étroitement liée à l'activité photosynthétique, qui fournit l'énergie (sous forme d'ATP et de NADPH) ainsi que des précurseurs carbonés (glucides) nécessaires au métabolisme secondaire. Ces composés volatils sont issus de voies métaboliques spécialisées et jouent divers rôles écophysologiques, notamment dans la défense contre les pathogènes, la communication interplantaire et l'attraction des pollinisateurs (Narishetty&Panchagnula, 2004).

I.1.4. Methodes d'extractions des huiles essentielles

I.1.4.1 Hydro-distillation

L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal (entier ou broyé) dans un alambic rempli d'eau, qui est ensuite porté à ébullition. Sous l'effet de la chaleur, l'eau produit de la vapeur qui entraîne les composés volatils présents dans la plante. Cette vapeur, en atteignant une surface froide (condenseur), se condense en un mélange liquide formé d'eau (hydrolat) et d'huile essentielle, séparés par décantation en raison de leur différence de densité (Porter, 2001).

Cette technique est généralement recommandée pour l'extraction d'huiles essentielles dont les composants sont thermorésistants. Toutefois, l'un des principaux inconvénients de l'hydrodistillation réside dans la difficulté à contrôler précisément la température du mélange eau-matière végétale. Cela peut entraîner des altérations de l'huile essentielle, notamment des changements de couleur, d'odeur ou de composition chimique (Delaveau, 1987).

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1.4.2 Distillation par entraînement à la vapeur d'eau

La distillation par entraînement à la vapeur est l'une des méthodes les plus anciennes d'extraction de substances aromatiques, introduite par les savants arabes au IX^e siècle. Dans cette méthode, le matériel végétal est placé au-dessus de l'eau, soutenu par une grille ou une plaque perforée, sans contact direct avec le liquide. L'eau chauffée au fond de l'alambic produit de la vapeur qui traverse les plantes, capturant au passage les molécules volatiles.

La vapeur ainsi enrichie en composés aromatiques est dirigée vers un condenseur, où elle se liquéfie. Le distillat obtenu se sépare naturellement en deux phases : une phase aqueuse appelée hydrolat (ou eau florale) et une phase huileuse constituée de l'huile essentielle. Cette dernière est ensuite récupérée par décantation (**Joulain, 1994 , Delaveau, 1987**).

I.1.4.3 Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une méthode innovante développée pour l'obtention de composés naturels tels que les huiles essentielles et les extraits aromatiques. Elle repose sur un système de chauffage basé sur le rayonnement micro-ondes, appliqué au matériel végétal placé dans une chambre à pression progressivement réduite. Ce procédé permet de chauffer sélectivement l'eau intracellulaire présente dans les tissus végétaux, générant de la vapeur qui entraîne les composés volatils. Cette vapeur forme un mélange azéotropique facilitant la séparation des huiles essentielles (**Romdhane, 1993**).

I.1.4.4 Extraction par hydro-diffusion

L'hydro-diffusion est une technique particulière de distillation à la vapeur d'eau, caractérisée par un flux de vapeur orienté de manière descendante, traversant le lit de matière végétale. Contrairement à la distillation classique où la vapeur monte, ici, elle est injectée par le haut de l'appareil et descend par gravité à travers les plantes, d'où le nom d'hydro-diffusion descendante ou hydro-diffusion assistée par gravité (**El Asbahani et al., 2015**).

I.1.5. Composition chimique des huiles essentielles

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'elles sont constituées de mélanges complexes et variables, comprenant des centaines de composés en proportions très diverses. Ces composés appartiennent principalement à deux grandes classes biogénétiques : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Gildo, 2006**).

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1.5.1 Composés terpéniques

Les composés terpéniques représentent la fraction majoritaire des constituants volatils des huiles essentielles. Il s'agit principalement de monoterpènes (C_{10}) et de sesquiterpènes (C_{15}), deux classes d'hydrocarbures formés respectivement de deux et trois unités d'isoprène. En raison de leur faible masse moléculaire et de leur haute volatilité, ces composés sont à l'origine de la fragrance caractéristique des huiles essentielles.

Ils peuvent être saturés ou insaturés, et présente des structures acycliques, monocycliques, bicycliques ou polycycliques. Ces hydrocarbures sont fréquemment associés à leurs dérivés oxygénés

Tels que les alcools, cétones, aldéhydes, esters, éthers qui jouent un rôle essentiel dans l'activité biologique et les propriétés organoleptiques des huiles essentielles (**Bruneton, 1999**).

I.1.5.1.1 Monoterpènes

Les monoterpènes, de formule brute $C_{10}H_{16}$, sont composés de deux unités d'isoprène. Ils constituent souvent la part la plus importante des huiles essentielles et se subdivisent en plusieurs sous-groupes selon leur structure (**Rahal, 2004**) :

- **Monoterpènes acycliques** : myrcène, ocimènes
- **Monoterpènes monocycliques** : α -terpinène, γ -terpinène, p-cymène
- **Monoterpènes bicycliques** : α -pinène, β -pinène, Δ^3 -carène, camphène, sabinène

I.1.5.1.2 Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes possèdent une structure plus complexe, avec une base carbonée C_{15} , issue de trois unités d'isoprène. Cette famille présente une grande diversité de structures chimiques et regroupe des composés variés tels que :

- **Sesquiterpènes hydrocarbonés**(ex. : β -caryophyllène)
- **Sesquiterpènes oxygénés**: alcools (farnésol), cétones (néral, patchoulol), lactones, etc.

Les sesquiterpènes sont généralement moins volatils que les monoterpènes, mais ils confèrent aux huiles essentielles des propriétés thérapeutiques intéressantes, notamment anti-inflammatoires et antimicrobiennes (**Bruneton, 2008**).

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1.5.2 Composés aromatiques dérivés du phénylpropane

En plus des terpénoïdes, certaines huiles essentielles contiennent des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, issus du métabolisme de la phénylalanine. Ces composés comprennent notamment des aldéhydes aromatiques (comme le cinnamaldéhyde), des alcools aromatiques (comme l'eugénol), des esters, et d'autres phénylpropanoïdes, souvent responsables de l'arôme spécifique de certaines plantes (Gildo, 2006).

I.2. Les espèces végétales

I.2.1. Description botanique *L'Origanum vulgare*

Origanum vulgare, communément appelé origan, est une plante aromatique vivace appartenant à la famille des Lamiacées. Elle se caractérise par des tiges droites, fines, à section carrée, souvent teintées de rouge et mesurant entre 20 et 80 cm de hauteur. Ces tiges présentent des arêtes bien marquées, typiques des espèces de cette famille.

Les feuilles, ovales, aiguës, pétiolées et finement dentées en bordure, varient considérablement en taille, les plus grandes étant situées à la base de la plante.

La floraison se manifeste par de petites fleurs rose pâle regroupées en inflorescences terminales. Cette disposition florale est remarquable au sein des Lamiacées. Le calice est constitué de cinq lobes sacrés, tandis que la corolle tubulaire, à quatre lobes, est environ deux fois plus longue que le calice.

Le fruit est un tétrakène, composé de quatre akènes lisses et de teinte sombre, logés dans un calice devenu rugueux à maturité. (Mahmoudi Yahia.1990)



Figure01 : Dessin d'*Origanum vulgare* selon (Ietswaart, 1980).

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.2.2. Taxonomie d'*Origanum vulgare*

La classification taxonomique d'*Origanum vulgare* d'après **Balfour (1860)** est la suivante:

Tableau .01 : Taxonomie d'*Origanum vulgare*.

Règne	Plantae
Embranchement	Angiosperme
Classe	Magnolipsida
Sous classe	Astériida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Sous famille	Stachyoidae
Genre	<i>Origanum</i>
Espèce	<i>Origanum vulgare</i>

I.2.3. Distribution géographique

I.2.3.1 Distribution géographique dans le monde

Selon **Taylor et Francis (2002)**, le genre *Origanum* est principalement localisé autour du bassin méditerranéen. En effet, 81 % de ses espèces sont exclusivement présentes dans l'est méditerranéen, notamment en Turquie, en Grèce et au Moyen-Orient.

L'espèce *Origanum vulgare* est quant à elle largement répartie à travers l'Eurasie et l'Afrique du Nord. Son aire de répartition s'étend des Açores et des îles Canaries, jusqu'à la Bretagne et la Scandinavie, et couvre également des régions plus orientales telles que la Chine et Taïwan (**Taylor et Francis, 2002**).



Figure02 : Distribution du genre *Origanum vulgare* au monde (Ietswaart, 1980)

I.2.3.2. Distribution géographique dans l'Algérie

En Algérie, on trouve l'Origan sous diverses formes botaniques qui se répartissent sur l'ensemble du littoral et même dans les régions intérieures jusqu'aux zones arides (Mebarki, 2010). En Algérie, il est représenté par une multitude d'espèces qui compliquent leur identification du fait de leurs variations et de leur propension à l'hybridation.

En résumé, l'origan est une espèce bien adaptée au climat méditerranéen d'Algérie et se rencontre à l'état sauvage dans de nombreuses régions du nord du pays, ainsi que dans des cultures locales.

I.3. Généralités sur les souches étudiées

I.3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (colibacille) appartient à la famille des entérobactéries. Environ 70 % des cellules possèdent un flagelle ; elles peuvent donc être mobiles ou immobiles. Elles ont la capacité de fermenter le lactose et de produire de l'indole. Ce sont des bacilles Gram négatifs à respiration aérobie-anaérobie facultative. Cette espèce est un hôte fréquent de la microflore intestinale commensale chez l'homme et les animaux à sang chaud. Son implantation dans le tractus intestinal survient durant les premières heures ou jours suivant la naissance (Avril, 1992 ; Prescott, 2007).

I.3.1.1. Classification :

- **Règne** : *Bacteria*
- **Embranchement** : *Proteobacteria*
- **Classe** : *Gamma proteobacteria*
- **Ordre** : *Enterobacteriales*

Chapitre I : synthèse bibliographique

- **Famille** : *Enterobacteriaceae*
- **Genre** : *Escherichia*
- **Espèce** : *coli*
(Castellani et Chalmers, 1919)

I.3.1.2 Pouvoir pathogène :

E. coli est responsable de diverses infections, notamment la majorité des infections urinaires, ainsi que des infections extra-intestinales. Elle est aussi une cause fréquente de diarrhée infantile dans les pays en développement et joue un rôle important dans les syndromes diarrhéiques chez l'adulte. La contamination peut se faire par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, ou par transmission directe entre individus dans des conditions d'hygiène déficiente (**Bleibtreu, 2016**).

I.3.1.3. Résistance aux antibiotiques :

Les souches d'*Escherichia. coli* sont généralement sensibles à la plupart des antibiotiques efficaces contre les bactéries Gram négatives. Cependant, en raison d'un usage excessif des antibiotiques, 40 % des souches sont désormais résistantes aux amino-pénicillines, aux carboxypénicillines et à l'association amoxicilline-acide clavulanique par production de pénicillinases. Ces souches peuvent être pathogènes et aussi transmettre des gènes de résistance à d'autres bactéries (**Talon, 2004 ; Fred, 2006; Paterson, 2006**).

I.3.2. *Pseudomonas aeruginosa* :

Pseudomonas aeruginosa a été identifié pour la première fois en 1882 par Gessard, qui a montré que le pigment bleu-vert pyocyanine provenait de ce micro-organisme (**Gessard, 1984**). C'est un bacille Gram négatif, en forme de bâtonnet, sans spores ni capsules, mobile grâce à un flagelle polaire monotriche (**Hafiane et Ravaoarino, 2008**).

I.3. 2.1. Classification :

- **Règne** : *Bacteria*
- **Division** : *Proteobacteria*
- **Classe** : *Gamma proteobacteria*
- **Ordre** : *Pseudomonadales*
- **Famille** : *Pseudomonaceae*
- **Genre** : *Pseudomonas*

Chapitre I : synthèse bibliographique

- **Espèce** : *Pseudomonas aeruginosa* (Migula, 1900)

I.3.2.2. Pouvoir pathogène

Pseudomonas. aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections aiguës et chroniques. Sa capacité pathogène est liée à une grande adaptabilité génomique et à la production de multiples facteurs de virulence (Ben Haj Khalifa et al., 2011).

I.3.2.3. Résistance aux antibiotiques

Cette bactérie est connue pour son adaptation rapide et son développement fréquent de résistances aux antibiotiques. Les molécules actives sont limitées : certaines β -lactamines (pipéracilline, ticarcilline, ceftazidime, céfépime, aztréonam, imipénème, méropénème, doripénème), les fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine), les aminosides (sauf kanamycine), la fosfomycine et la colimycine. Cependant, les résistances à ces traitements sont courantes, dues à des mutations chromosomiques et à des gènes transférables. *Pseudomonas. aeruginosa* produit naturellement une céphalosporinase qui lui confère une résistance intrinsèque aux céphalosporines (Mérens et al., 2011).

I.3.3. *Staphylococcus aureus* :

La famille des *Staphylococcaceae* comprend quatre genres, parmi lesquels *Staphylococcus* est le plus important. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives Gram positives, formant des amas en forme de grappes de raisin. Elles sont immobiles, non sporulées, catalase-positives, oxydase-négatives, et fermentent le glucose. Leur paroi contient des acides teichoïques (Prescott, 2007).

I.3.3.1. Classification

- **Règne** : *Bacteria*
- **Division** : *Firmicutes*
- **Classe** : *Bacilli*
- **Ordre** : *Bacillales*
- **Famille** : *Staphylococcaceae*
- **Genre** : *Staphylococcus*
- **Espèce** *Staphylococcus aureus*

(Ludwig et *al.*, 2010)

I.3.3.2. Pouvoir pathogène

Bien que commensal, *Staphylococcus aureus* provoque de nombreuses infections chez l'homme: affections cutanées (impétigos, folliculites, furoncles, panaris), infections des muqueuses (conjonctivites, otites, pneumonies). Il possède de nombreux facteurs de virulence, notamment des toxines responsables de toxi-infections alimentaires (Lowy, 1998 ; Shallcross, 2013).

I.3.3.3. Résistance aux antibiotiques

La multirésistance chez *Staphylococcus aureus* est préoccupante. Les souches résistantes aux β -lactamines produisent des pénicillinases qui détruisent le cycle β -lactame. Elles peuvent aussi inactiver les aminosides via des enzymes spécifiques, conférant une résistance à la gentamicine, amikacine, kanamycine, etc. (Prescott, 2012).

I.3.4. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est une bactérie Gram positive, aérobic, formant des endospores, catalase-positif, habituellement présente dans le sol et considérée comme ubiquitaire. Ses cellules sont des bâtonnets droits, de 2 à 4 μm de longueur sur 0,5 à 2 μm de largeur. Cette espèce est généralement bénéfique et non pathogène, mais peut occasionnellement provoquer des infections opportunistes chez les immunodéprimés (Loison, 2013).

I.3.4.1. Classification

- **Domaine** : *Bacteria*
- **Phylum** : *Bacillota*
- **Classe** : *Bacilli*
- **Ordre** : *Caryophanales*
- **Famille** : *Bacillaceae*
- **Genre** : *Bacillus*
- **Espèce** : *Bacillus subtilis*
(Ehrenberg, 1835 ; Cohn, 1872)

I.3.4.2. Pouvoir pathogène

Le genre *Bacillus* comprend plusieurs espèces importantes, certaines saprophytes, d'autres pathogènes comme *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus Licheni formis* et *Bacillus Subtilis*. *Bacillus cereus* est lié à des toxi-infections alimentaires diarrhéiques et émétiques (causées par la toxine céréulide) après consommation d'aliments contaminés (**Jean-Pierre Facon et Isabelle Desforges, 2021**).

I.3.4.3 Résistance aux antibiotiques

Bacillus subtilis, en raison de leurs endospores très résistantes, sont capables de survivre à divers agents physiques et chimiques, dont la chaleur, le froid, la déshydratation, les désinfectants et certains antibiotiques (**Paul Vos et al., 2011**). Ils sont largement présents dans divers environnements, y compris naturels et hospitaliers (**DraganaMiljaković et al., 2020**).

I.3.5. *Candida albicans*

Candida albicans est une levure diploïde, mesurant de 3 à 15 µm, non pigmentée et aérobie (**Chuet et al., 1993**). Elle se reproduit asexuellement par bourgeonnement multilatéral (blastospore) (**Graser et al., 1996**), formant des colonies blanc crème. Elle existe sous deux formes : levure (forme habituelle) et mycélium (forme pathogène). La morphologie est influencée par le pH, la température et la fertilité du milieu (**Sudbery, 2001**).

I.3.5.1. Classification

- Règne : *Fungi*
- Division : *Ascomycètes*
- Sous-division : *Saccharomycotina*
- Classe : *Saccharomycètes*
- Ordre : *Saccharomycetales*
- Famille : *Saccharomycetaceae*
- Genre : *Candida*
- Espèce : *Candida albicans*

I.3.5.2. Pouvoir pathogène

Les *Candidas* ont souvent endogènes ou exogènes et ne deviennent pathogènes qu'en présence de facteurs favorisants. Les candidoses peuvent être localisées (peau, muqueuses) ou invasives (souvent nosocomiales), notamment chez les patients immunodéprimés. En grande quantité, *Candida. albicans* provoque un érythème douloureux parfois couvert de dépôts blanchâtres (Anofel, 2014).

I.3.5.3. Résistance aux antifongiques

La résistance aux antifongiques est un problème croissant, surtout chez les patients immunodéprimés. Les mécanismes incluent des mutations dans les gènes cibles, une surexpression des pompes à efflux et des modifications de la membrane cellulaire

Chapitre 2 :

Matériels et méthodes



Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Cadre général de l'étude

Cette étude a été réalisée au laboratoire d'hygiène de la wilaya de Skikda, relevant de l'établissement public de santé de proximité (EPSP). C'est la structure qui a permis la mise en œuvre des travaux expérimentaux, notamment l'extraction, la caractérisation et l'évaluation antimicrobienne de l'huile essentielle *d'origanum vulgare*.

II.1.1. L'objectif de l'étude

Le présent mémoire a pour objectif d'évaluer les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle issue de la plante *origanum vulgare*

II.2. Matériels utilisés

II.2.1. Matériels non biologique

Appareillages, verrerie et autre.	Produit et réactifs.	Milieux de cultures.
<ul style="list-style-type: none">- Autoclave.- Bain marie.- Microscope.- Lames.- Tubes à essai.- Ecouvillons.- Balance.- Papiers watt man.- Bec Bunsen.- Etuve.- Boîtes de pétries.- Lance de platine.- Micropipettes.- Les ampoules.	<ul style="list-style-type: none">- DMSO.- Violet de gentiane.- Lugol.- Fuschine.- Alcool.- L'eau physiologique.- Huiles d'émulsion.	<ul style="list-style-type: none">- Gélose nutritive.- Gélose Sabouraud.- Gélose Muller-Hinton.- Bouillon Muller-Hinton.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.2.2. Matériels biologique

II.2.2.1. Matériels végétal

a. Critères de choix de la plante

Le choix de la plante *Origanum vulgare*, localement connue sous le nom de zaatar, repose sur ses usages traditionnels en médecine populaire, en particulier pour ses propriétés antiseptiques, anti-inflammatoires, digestives, ainsi que pour son potentiel bactéricide et antifongique. Son huile essentielle est reconnue pour ses puissantes propriétés antimicrobiennes, mises en évidence dans plusieurs études antérieures.



Figure 03: *Origanum vulgare* medicinal herb from Algeria (photo originale).

➤ Justification du choix de la plante

Le choix de la plante *Origanum vulgare* repose sur ses usages traditionnels en médecine populaire, en particulier pour ses propriétés antiseptiques, anti-inflammatoires et digestives. Par ailleurs, plusieurs études récentes ont mis en évidence la richesse de son huile essentielle en composés bioactifs présentant des effets antimicrobiens et antioxydants.

b. Récolte

La plante *Origanum vulgare* été récoltée le 1er avril dans la région de Aïn Bouziane, située dans la wilaya de Skikda au nord-est de l'Algérie (**figure 03**), aux coordonnées géographiques précises de 36°35'53" de latitude nord et 6°45'05" de longitude est (soit 36,598° N, 6,751° E). Cette zone, à caractère montagneux, se trouve à environ 20 km à l'est du chef-lieu de la wilaya, dans la daïra de Sidi Mezghiche (**DPSB, 2016DB.COM, 2025**)



Figure .04: situation géographique du Ain Bouziane (google maps)

Le climat de la région est de type semi-aride, caractérisé par des hivers froids. Ces conditions écologiques favorisent la croissance spontanée de plusieurs espèces aromatiques et médicinales, dont *Origanum vulgare*. La récolte a été réalisée manuellement, en prélevant les parties aériennes de la plante (tiges, feuilles et fleurs) au stade de floraison, considéré comme la période optimale pour la concentration en composés volatils bioactifs. Les échantillons ont ensuite été transportés dans des sacs en papier afin de préserver leurs propriétés, puis séchés à l'ombre, dans un endroit bien ventilé, en vue de la préparation à l'extraction de l'huile essentielle. .

c. Séchage

Les feuilles de *Origanum vulgare* ont été séchées à une température ambiante dans un endroit aéré et ombragé pendant une semaine, dans des étagères recouvertes de papier peint afin d'éviter tout dépôt de moisissures (Owen et Johns, 1999).



Figure .05 : *Origanum vulgare* (A) avant séchage, (B) après séchage(photo originale).

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.2.2.2. Microorganismes testés

Tableau 02 : Caractéristiques des souches microbiennes utilisées dans l'étude.

Souches bactériennes	Milieux de conservation	La référence	Gram
<i>Bacillus spizizenii</i> (ATCC)	Bouillon	6633	+
<i>Candida albicans</i>	Gélose	D'origine clinique	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC)	Gélose	1117	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC)	Gélose	25923	+
<i>Escherichia coli</i> (ATCC)	Gélose	25922	-

On conserve les souches dans les boîtes de pétris à 4 °C.

II.3. Protocole d'extraction des huiles essentielles

II.3.1. Préparation de la matière végétale

- Une quantité de 15 kg de plante sèche (*Origanum vulgare*) a été pesée.
- Le matériel végétal a ensuite été introduit dans la cuve de l'alambic.
- Un volume de 75 litres d'eau distillée a été ajouté afin d'assurer un transfert thermique optimal et de produire une quantité suffisante de vapeur (Chebaibi & Fahim, 2016).

II.3.2. Hydrodistillation

- Un dispositif de chauffage au gaz a été utilisé pour chauffer l'alambic.
- Ce processus a permis de maintenir une ébullition constante pendant environ 90 minutes.
- La vapeur produite durant cette étape a permis d'extraire les substances volatiles contenues dans les parties aériennes de la plante
- Cette opération est illustrée dans la (figure 06) (Chebaibi&Fahim, 2016).



Figure 06: méthode d'hydrodistillation (photo originale).

- La vapeur enrichie en huile essentielle a été dirigée vers un condenseur pour être refroidi
- Ce processus de condensation a permis d'obtenir un distillat composé d'un mélange d'hydrolat (eau aromatique) et d'huile essentielle (**Chebaibi&Fahim, 2016**)
- Le distillat a été récupéré dans un récipient en verre adapté à cet effet.
- En raison de sa densité plus faible, l'huile essentielle s'est naturellement séparée en flottant à la surface de l'hydrolat (**Chebaibi&Fahim, 2016**).
- Le mélange obtenu a été transféré dans une ampoule à décanter pour séparer les deux phases.
- Après un temps de repos suffisant, les deux phases se sont dissociées.
- La couche supérieure, correspondant à l'huile essentielle, a été soigneusement recueillie (**chebaibi&fahim 2016**).

✓ Conservation

Il est indispensable de prendre certaines précautions pour la conservation de l'huile essentielle (**BURT, 2004**). L'huile essentielle récupérée est emballée dans un tube à essai protégé par du papier aluminium, soigneusement scellé pour prévenir toute modification due à la lumière et à l'oxygène contenu dans l'air. Les bouteilles sont maintenues à une température de $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

II.3.3. Calcul du rendement

D'après la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle (R) correspond à la relation entre la masse de l'huile essentielle extraite (M HE) et la masse de la matière végétale employée (MS). La formule suivante donne le résultat :

$$R (\%) = \left(\frac{MHE}{MS} \right) \times 100$$

Où :

- **R** : Rendement de l'huile essentielle en %.
- **MHE** : La masse d'huile essentielle en g.
- **MS** : La masse de la matière végétale utilisée en g.

II.4. Évaluation de l'activité anti microbienne

II.4.1. Revivication et repiquage des souches bactériennes

La revivification des souches, une étape nécessaire avant leur utilisation car leur activité biologique est nulle à l'état conservé. Cette revivification a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure.

Elle se fait en réalisant un repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance, selon **Guiraud J, (2003)** dans le cas des espèces phytopathogènes.

II.4.1.1. Identification des souches bactérienne

II.4.1.1.1. Examen macroscopique

L'observation macroscopique se focalise sur les caractéristiques visibles sans l'aide d'un microscope, notamment la morphologie, les dimensions, la teinte et l'aspect externe des colonies bactériennes (**Chibi, 2015**).

➤ Examen microscopique (Coloration de Gram)

❖ Principe

La coloration de Gram est une méthode essentielle en bactériologie. C'est une technique de double coloration qui permet de différencier les bactéries non seulement par leur forme et leur structure, mais surtout en fonction de leur affinité pour les colorants, liée à la composition chimique de leur membrane cellulaire (**Abdelmalek, 2016**).

❖ La méthode de coloration de Gram :

- Préparer un frottis à partir d'une culture bactérienne fraîche, puis laisser sécher à l'air libre.
- Recouvrir entièrement le frottis de cristal violet et laisser agir pendant 1 minute, puis rincer doucement avec de l'eau distillée.
- Appliquer du lugol sur le frottis et laisser reposer pendant 1 minute avant de le rincer à l'eau distillée

Chapitre II : Matériels et méthodes

- Décolorer le frottis avec de l'alcool pendant 15 à 30 secondes, puis rincer immédiatement à l'eau.
- Appliquer la fuchsine sur le frottis pendant 1 minute, puis rincer abondamment avec de l'eau distillée.
- Sécher le frottis à l'air libre ou en le passant brièvement au-dessus de la flamme d'un bec

❖ La lecture

L'observation au microscope a été effectuée à l'aide de l'objectif $\times 100$ avec immersion. Grâce à la coloration différentielle, les bactéries à Gram positif apparaissent en violet foncé, tandis que celles à Gram négatif prennent une teinte rose à rouge. Cette variation de couleur s'explique par la structure de leur paroi cellulaire, qui détermine leur capacité à retenir les colorants (Delarras, 2014).

II.4.1.1.2. Méthode de l'aromatogramme

➤ Principe

Cette technique est connue sous diverses désignations : technique de l'aromatogramme, approche de l'antibioaromatogramme ou encore méthode de Vincent (Marie-Cécile Péron, 2006). Également appelée méthode de diffusion sur disques, elle a été retenue dans le cadre de cette étude pour évaluer l'effet antimicrobien de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.

La méthode consiste à imbiber des disques de papier stériles avec l'huile essentielle, puis à les déposer sur une boîte de Pétri contenant une gélose ensemencée avec la souche bactérienne ciblée. Après incubation, l'apparition d'un halo clair autour des disques témoigne de l'activité antimicrobienne de l'huile testée.

a. Préparation des solutions

L'huile essentielle extraite d'*Origanum vulgare* a été diluée à plusieurs concentrations (100%, 50%, 25%, et 1%,) en utilisant le Tween80 (DMSO) comme solvant.

Les différentes concentrations ont été obtenues en ajustant les volumes d'huile essentielle et de DMSO selon les proportions nécessaires.

La solution de base, non diluée (100 %), a été utilisée directement sans modification. Chaque dilution a été réalisée soigneusement en respectant les ratios prédéfinis.



Figure07 : les dilutions d'HE (photos original)

b. Préparation des milieux

Des boîtes de Pétri contenant 20 μ L de gélose Mueller-Hinton (MH) ont été préparées, puis laissées à température ambiante (**figure08**) pour permettre la solidification du milieu. Une fois la gélose solidifiée, les boîtes ont été mises à sécher pendant 30 minutes à température ambiante afin de retirer l'excès d'humidité présent à la surface (**yanguela ,2011**).



Figure 08: Mueller Hinton dans les boites de Pétri (Photo original).

c. Ensemencement

Un écouvillon stérile a été plongé dans la suspension bactérienne, puis égoutté légèrement contre la paroi interne du tube. La gélose de chaque boîte de Petri a ensuite été ensemencée par des stries répétées, en réalisant trois passages croisés avec une rotation d'environ 60° entre chaque passage, de manière à assurer une répartition homogène de l'inoculum (**figure09**). Les boîtes ont ensuite été laissées à sécher à température ambiante pendant environ cinq minutes avant l'application des disques.



Figure 09 : ensemencement des bactéries (photo originale)

d. Application des disques

- Afin d'évaluer qualitativement in vitro le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, nous avons utilisé la technique de diffusion sur disque en milieu gélosé, également appelée méthode des disques (**Dayal & Purohit, 1971**). Il s'agit d'une méthode d'évaluation qualitative in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles, des extraits méthanoliques et des infusions.
- Dans cette méthode, des disques de papier Whatman n°1 (6 mm de diamètre) sont imprégnés des différents extraits de la plante étudiée (**figure 10**).
- Ces disques sont ensuite déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface avec une suspension bactérienne. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 heures.



Figure 10 : application des disque (photo originale)

e. Incubation

- Après diffusion, les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37 °C.
- Après l'incubation l'effet des huiles essentielles se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance.
- Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (**Choi et al.,2006**).

Chapitre II : Matériels et méthodes

➤ Les tests ont été répétés trois fois, des disques imprégnés de DMSO utilisés comme (témoins négatifs) .

f. Lecture de résultats

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches (**Choi et al., 2006**).

- **Non sensible (-)** : diamètre 8mm
- **Sensible(+)** : diamètre compris entre 8à14 mm
- **très sensible (++)** : diamètre 15à 20mm
- **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre 20mm.

II.4.1.1.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle d'*origanum vulgare* a été réalisée afin d'évaluer la plus faible concentration capable d'inhiber visiblement la croissance bactérienne des souches étudiées.

La technique utilisée pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est celle décrite par **Guinoiseau (2010)**. Elle repose sur la méthode de dilution en milieu liquide, permettant de tester une gamme décroissante de concentrations d'huile essentielle (HE), comprises entre 80 mg/mL et 0,15 mg/mL. Cette gamme est obtenue par des dilutions successives au demi (1/2, 1/4, 1/8, ..., jusqu'à 1/256) à partir d'une solution mère.

II.4.1.1.2.1. La méthode de macrodilution

- **Préparation de la solution mère** : La solution mère de l'huile essentielle d'*origanum vulgare*(80 mg/mL) a été préparée en diluant 88,9 µL d'huile dans 911,1 µL de DMSO stérile. Le mélange a été vortexé, étiqueté, puis conservé à 4 °C à l'abri de la lumière (**Wilkinson, 2006**).
- **Préparation des dilutions** : Une série de dix tubes stériles (T1 à T10) a été préparée par dilutions successives de la solution mère d'huile essentielle (80 mg/mL) dans du bouillon Mueller-Hinton, selon la réduction au demi-volume (**figure 11**).

Les concentrations finales obtenues allaient de 40 mg/mL (T1) à 0,078 mg/mL (T10). Chaque dilution a été réalisée sous conditions aseptiques en transférant 1 mL de la solution

Chapitre II : Matériels et méthodes

précédente dans 1 mL de bouillon, puis homogénéisée avant l'inoculation bactérienne (Wilkinson, 2006).

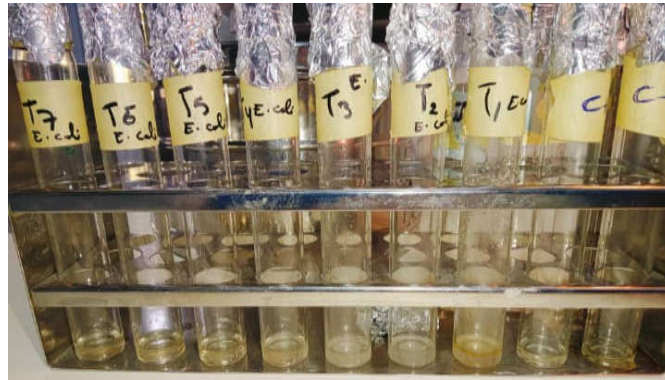


Figure 11 : préparation des dilutions(photo originale) .

- **Préparation de l'inoculum :** Un inoculum bactérien standardisé a été préparé à une concentration correspondant à 0,5 sur l'échelle de Mc Farland (figure 12). Un volume de 100 μ L de cette suspension a été ajouté à chaque tube de dilution (de T1 à T10), ainsi qu'aux tubes témoins, conformément à la méthode décrite par Wilkinson (2006).
- **Incubation :** Incuber les tubes contenant les dilutions et les contrôles à 37°C pendant 18 à 24 heures ,Après une période d'incubation, on observe visuellement la présence ou l'absence de turbidité dans les tubes. La concentration minimale inhibitrice (CMI) désigne la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien capable d'empêcher toute croissance visible du microorganisme testé (Hussainetal. (2009).



Figure 12 : préparation de l'inoculum bactérienne (photo originale)

II.4.1.1.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB correspond à la concentration la plus faible d'huile essentielle qui élimine 99,9% de l'inoculum bactérien, après une incubation de 24 h. Des échantillons ont été prélevés sur chaque boîte qui n'a pas montré de croissance bactérienne lors du test précédent.

Chapitre II : Matériels et méthodes

Ces échantillons ont ensuite été repiqués sur une gélose nutritive, puis incubés à 37 °C pendant 24 heures. La concentration minimale bactéricide représente la plus petite concentration d'huile essentielle à laquelle aucune croissance n'a été notée (**Haddouchi, 2009**).

II.4.1.1.4. Détermination de la CMB à partir de la méthode de macrodilution

La concentration minimale bactéricide (CMB) a été déterminée selon les étapes suivantes :

- **Incubation des tubes de CMI** : Après 24 heures d'incubation des tubes utilisés pour la détermination de la CMI, la même gamme de concentrations a servi à évaluer la CMB de l'huile essentielle testée, selon la méthode de macrodilution en milieu liquide (**Bouchaale, 2015**).
- **Prélèvement des échantillons** : À l'aide d'une micropipette stérile, un volume de 10 à 20 µL a été prélevé à partir de chaque tube ne présentant pas de croissance visible.
- **Ensemencement sur gélose** : Les volumes prélevés ont été étalés par stries sur des boîtes de Pétri contenant une gélose Mueller-Hinton stérile.
Un contrôle a été réalisé en ensemençant une boîte de Pétri avec un milieu nutritif stérile à partir du tube témoin positif (C+).
- **Incubation**
Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures (ou selon les conditions spécifiques de la souche bactérienne testée)
 - **Absence de colonies** : action bactéricide, la concentration testée correspond à la CMB.
 - **Présence de colonies** : inhibition de la croissance sans élimination complète des bactéries. (**Bouchaale, 2015**).

Chapitre 3

Résultats et discussions



Chapitre III : Résultats et discussions

III .1.Rendement d'extraction et caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle :

Tableau 03: Rendement d'extraction et Caractéristiques organoleptiques de l'HE d'*Origanum vulgare*

Huile essentielle	Rendement (%)	Caractéristiques organoleptiques		
		Odeur	Aspect	Couleur
<i>Origanum vulgare</i>	0.89±0.050	De thymol	Liquide-visqueux	Jaune claire



L'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* permis d'obtenir un rendement satisfaisant de **0,89 ± 0,050 %**, présenté dans le **tableau 03** Ce rendement constitue un indicateur clé de l'efficacité de la méthode employée ainsi que de la qualité de l'huile extraite. Un rendement élevé reflète une extraction optimale, critère essentiel pour une production à grande échelle.


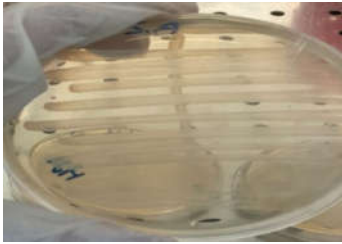



Les résultats obtenus concordent avec ceux rapportés par **Benkaci-Ali et al. (2012)** et par **Tria Ahlem Meriem & Zenati Nadia Rachida (2024)**, qui attribuent les variations de rendement principalement aux conditions climatiques et aux pratiques culturelles. Toutefois, notre rendement reste inférieur à ceux mentionnés dans certaines études de la littérature. En particulier, **Semra et al. (2013)** ont obtenu **2,2 %** à partir d'une plante récoltée dans la région de Zighoud Youcef (wilaya de Constantine), un résultat nettement supérieur au nôtre.

Ces différences peuvent s'expliquer par de multiples facteurs. La période de récolte, déterminante pour la quantité et la composition des composés volatils, est souvent considérée comme primordiale. S'y ajoutent : la zone géographique de collecte et le climat local, le développement et le degré de fraîcheur du matériel végétal, le prétraitement du végétal (durée et conditions de séchage), enfin, la méthode et le type d'appareillage d'extraction choisis (**Benbouali, 2006**).

III .2. Identifications des souches bactériennes

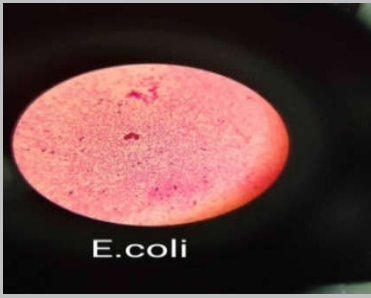




Chapitre III : Résultats et discussions

Tableau04 :Résultats des observations macroscopique des souches bactériennes

les souches bactériennes	Observation macroscopique	Description
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922		circulaires, avec des bords réguliers et une surface lisse. blanchâtre crémeuses, légèrement visqueuses
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923		circulaires, avec des bords réguliers et une surface lisse. colonies dorées à jaune-crèmeuses
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC6633		irrégulières, blanc crémeux. Texture: rugueuses,
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 1117		circulaires, avec des bords lisses lisses, brillantes
<i>Condida albicans</i>		arrondie des bords lisses blanche à crème, .crémeuses,

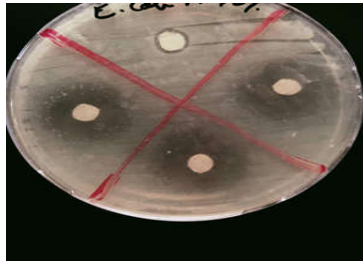
Chapitre III : Résultats et discussions

Tableau 05: Résultats des observations microscopique des souches bactériennes

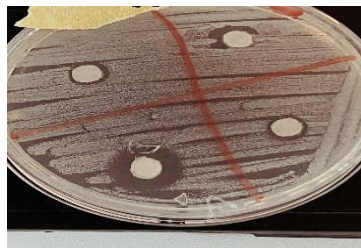
Les souches microbienne	Coloration de Gram X 100	Description
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	 E.coli	bâtonnet, Gramnégatif généralement de 0,5 micromètre de diamètre
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	 Staphylococcus	forme de sphères, ou coques.Gram- positives grappes de raisins. 0,5 t 1,0 micromètre de diamètre
<i>Bacillus spizizenii</i> (ATCC6633)	 Bacillus	des bacilles. Gram- positives en chaînes. à 10 micromètres de long et de 0,5 à 1,0 micromètre de large.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC1117)	 Pseudomonas	bâtonnets (bacilles), Gram-négatives. en paires,. 0,5 et 1,0 micromètre de large et 1,5 à 5,0 micromètres de long.
<i>Condidaalbicans</i> (ATCC)	 Candida	ovales à rondes. 2–6 µm de diamètre. Présence de bourgeonnement

III.3. L'activité antibactérienne

Les résultats de l'aromatogramme in vitro de l'HE de d'*Origanum vulgare*.sont représentés dans la Figure 13 et le tableau 06



Escherichiacoli ATCC 25922



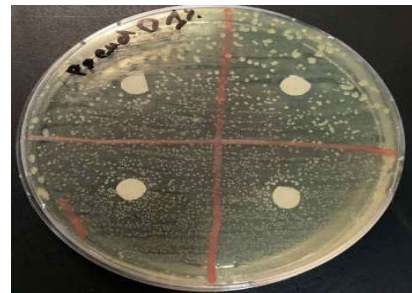
candida albicans



staphylococcus aureus ATCC 25923



Bacillus spizizenii ATCC6633



Pseudomonas aeruginosa ATCC1117

Figure 13 :Les résultats de l'aromatogramme in vitro de l'HE de d'*Origanum vulgare*

Tableau 06: Les diamètres des zones d'inhibitions selon la dilution de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*

Souche bactérienne	100 %	50 %	25 %	1 %
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	26 ± 1 mm	19 ± 1 mm	12 ± 0,5 mm	00 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	20 ± 2 mm	14 ± 1 mm	00 mm	00 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC1117	03± mm	02± mm	00 mm	00 mm

Chapitre III : Résultats et discussions

<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC6633	21 ± 2 mm	00 mm	00mm	00 mm
<i>Candida albicans</i>	26 ± 1 mm	22 ± 1 mm	13 ± 2 mm	00mm
Contrôle négatif (DMSO)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* été évaluée selon la méthode de diffusion sur disque, chaque pastille imprégnée contenant 20 µL d'huile essentielle. Le potentiel inhibiteur a été quantifié par la mesure des diamètres des zones d'inhibition, selon l'échelle définie par **Ponce et al., (2003)** :

- **Pas sensible (-)** : diamètre ≤ 8,0 mm
- **Moyennement sensible (+)** : diamètre > 8,0 mm et ≤ 14,0 mm
- **Sensible (++)** : diamètre > 14,0 mm et ≤ 20,0 mm
- **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre ≥ 20,0 mm

III.3.1. *Escherichia coli* ATCC 25922

L'efficacité la plus marquée a été observée contre *Escherichia coli*, avec une zone d'inhibition de 26 ± 1 mm à 100 %, 19 ± 1 mm à 50 %, et 12 ± 0,5 mm à 25 %. Aucune inhibition n'a été notée à 1 %. Ces résultats soulignent la sensibilité de cette bactérie Gram négatif aux composés phénoliques de l'huile, notamment le carvacrol et le thymol, connus pour leur action sur la perméabilité membranaire bactérienne (**Dorman et al., 2000**). Ils sont en accord avec les observations de **Bouzidi et al. (2017)** et **d'Amrouni et al. (2014)**.

III.3.2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1117

Les résultats ont montré que *Pseudomonas aeruginosa* présente une forte résistance à l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, avec un halo d'inhibition de seulement 3 ± 1 mm à 100 %, 2 ± 1 mm à 50 %, et aucune inhibition aux concentrations de 25 % et 1 %. Ce résultat confirme les données de **Bendahou et al. (2008)** et **Béjaoui et al. (2013)**, qui rapportent la résistance de cette souche, due à la structure particulière de sa membrane externe (**Mann et al., 2000**).

III.3.3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Chapitre III : Résultats et discussions

Staphylococcus aureus a montré une sensibilité notable, avec des diamètres d'inhibition de 20 ± 2 mm à 100 % et de 14 ± 1 mm à 50 %. Aucune inhibition n'a été observée à 25 % ni à 1 %. Ce profil reflète une sensibilité modérée et diffère des résultats paradoxaux rapportés par d'autres études (**Ponce et al., 2003** ; **Tria et Zenati, 2024**), mais reste proche de ceux de **Bekhechi et al. (2008)**, qui avaient obtenu un diamètre d'environ 22 mm à 100%.

III.3.4. *Bacillus spizizenii* ATCC 6633

Une zone d'inhibition significative de 21 ± 2 mm a été observée uniquement à 100 %, tandis qu'aucune activité n'a été notée à 50 %, 25 % et 1 %. Ce résultat indique une efficacité marquée à forte concentration, en accord avec les travaux de **Boughendjioua et Seridi (2017)** sur *Bacillus subtilis*.

III.3.5. *Candida albicans*

L'huile essentielle a montré une activité antifongique intéressante, avec des zones d'inhibition de 26 ± 1 mm à 100 %, 22 ± 1 mm à 50 %, et 13 ± 2 mm à 25 %. Aucune inhibition n'a été détectée à 1 %. Ces résultats confirment les données de **Giordani et al. (2004)** concernant l'efficacité des huiles riches en carvacrol et thymol contre *Candida albicans*.

III.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la plus faible concentration des échantillons testés pour laquelle aucune croissance visible du microorganisme n'a été observée, conformément à la méthode décrite par **Ponce et al. (2003)**.

Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE d'*Origanum vulgare*, présentées dans le **tableau 07** révèlent une efficacité variable en fonction des souches microbiennes testées

Tube	HE finale (mg/ml)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 1117	<i>Candida albicans</i>
T1	80	+	+	+	+	+
T2	40	+	+	+	+	+
T3	20	+	+	+	+	+
T4	10	+	+	+	+	-
T5	5	+	+	+	+	CMI
T6	2.5	CMI	CMI	CMI	CMI	-

Chapitre III : Résultats et discussions

T7	1.25	–	–	–	–	–
T8	0.625	–	–	–	–	–
T9	0.312	–	–	–	–	–
T10	0.156	–	–	–	–	–

+ : présence d'inhibition (activité antimicrobienne)

– : absence d'inhibition

La CMI de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* a été déterminée en testant des concentrations allant de 80 à 0,156 mg/mL.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle (HE) testée a été réalisée par la méthode de dilution en milieu liquide contre cinq souches microbiennes de référence : *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus spizizenii* ATCC6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC1117 et *Candida albicans*. Les résultats ont montré des variations de sensibilité selon les concentrations testées.

Les résultats de cette étude ont permis de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* contre différentes souches microbiennes. Pour *Escherichia coli*, une croissance a été observée jusqu'à 5 mg/ml, avec une inhibition complète à partir de 2.5 mg/ml. Cette CMI est inférieure à celle rapportée par **Burt et al. (2004)**, qui ont observé une inhibition à partir de 5 mg/ml (0,5 %), mais supérieure à celle de **Morris et al. (1979)** (0,5 mg/ml) et de **Hussain et al. (2009)**, qui ont obtenu une CMI de 0,83 mg/ml avec *Thymus vulgaris*. Pour *Staphylococcus aureus*, la CMI est également de 2.5 mg/ml, ce qui traduit une activité comparable à celle observée contre *E. coli*. Cette valeur est néanmoins supérieure à celle rapportée par **Badi Selma et al. (2019)**, qui ont trouvé une CMI de 0,625 mg/ml. D'après **Teixeira Duarte et al. (2005)**, une CMI inférieure à 2 mg/ml traduit un fort pouvoir antimicrobien, ce qui suggère que l'huile testée possède une activité modérée. De même, *Bacillus spizizenii* a montré une sensibilité similaire avec une CMI estimée à 2.5 mg/ml, reflétant une activité modérée contre cette bactérie Gram positive. Enfin, *Candida albicans* a montré une croissance jusqu'à 10 mg/ml, à partir de laquelle une inhibition complète est observée, indiquant une CMI significativement plus élevée que pour les bactéries testées.

Chapitre III : Résultats et discussions

Tableau 08 : Les résultats de CMB de l'huile essentielle de *Origanum vulgare*

Microorganisme	CMB(mg/ml)	Effet
<i>Escherichia coli</i>	5	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	>5	Bactériostatique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	/
<i>Bacillus spizizenii</i>	2.5	Bactéricide
<i>Candida albicans</i>	5	Fongicide

L'évaluation de la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'huile essentielle *d'Origanum vulgare* permis de déterminer son effet létal ou inhibiteur sur les différentes souches microbiennes testées. Les résultats obtenus montrent un effet bactéricide à une concentration de 5 mg/mL contre *Escherichia .coli* Pour *Bacillus spizizenii*, la CMB est plus faible, à 2.5 mg/mL, indiquant une plus grande sensibilité de cette souche Gram positive à l'huile testée. En revanche, la CMB contre *Staphylococcus aureus* est supérieure à 5 mg/mL, ce qui suggère un effet bactériostatique dans les concentrations utilisées. Concernant *Candida albicans*, une CMB de 5 mg/mL a été observée, traduisant une activité fongicide de l'huile essentielle. Ainsi, l'huile *d'Origanum vulgare* présente une activité antimicrobienne à la fois bactéricide et fongicide contre la majorité des microorganismes testés, à l'exception de *Staphylococcus. aureus*, pour lequel seule une inhibition de la croissance a été notée sans effet létal dans les limites des concentrations appliquées.

Conclusion générale



Conclusion générale

Face à l'émergence préoccupante de bactéries multi résistantes aux antibiotiques, les recherches s'orientent de plus en plus vers des alternatives naturelles, parmi lesquelles les huiles essentielles occupent une place de choix en raison de leur richesse en composés bioactifs et de leur potentiel thérapeutique.

Dans ce contexte, notre étude s'est intéressée à *Origanum vulgare*, une espèce aromatique de la famille des *Lamiacées*, largement répandue en Algérie. L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation à partir des parties aériennes de la plante, avec un rendement de 0,89 %.

L'activité antimicrobienne de cette huile essentielle a été évaluée sur quatre souches bactériennes de référence notamment *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1117, et *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 ainsi que sur la levure *Candida albicans* ATCC. L'évaluation a été réalisée à l'aide de la méthode de diffusion sur milieu gélosé, par la mesure des diamètres des zones d'inhibition, ainsi que par la méthode de macrodilution en milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricide/fongicide (CMB).

Les résultats ont mis en évidence une activité antimicrobienne marquée de l'huile essentielle, notamment contre *Escherichia coli* 26 mm et *Candida albicans*, et dans une moindre mesure contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus spizizenii* CMI de 2,5 mg/mL, Cependant *Pseudomonas aeruginosa* a montré une résistance complète à l'huile testée. L'activité bactéricide et fongicide a été confirmée pour la majorité des souches par la détermination des CMB.

Bien que préliminaires, ces résultats confirment le potentiel prometteur de *Origanum vulgare* comme source de molécules d'intérêt antimicrobien

Dans la continuité de ce travail, plusieurs pistes de recherche peuvent être envisagées :

- ✓ Caractériser la composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM), Isoler, purifier et identifier les principes actifs responsables des activités observées
- ✓ Étudier les mécanismes d'action des composés bioactifs sur les micro-organismes cibles
- ✓ Élargir les investigations à d'autres propriétés biologiques : activités antivirale, anticancéreuse ,anti-inflammatoire, antioxydante.

Liste des références



Liste des références

A

- **A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EA, Casabianca H, et al. (2015).** Essential oils: from extraction to encapsulation. *Int J Pharm*;483(1-2):220–2

A., Marouf, Z., Rhazi-Filali, F., Fahim, M., & Ed-Dra, A. (2016). Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*, 14(6), 355-362.

AFNOR. (2004). Huiles essentielles. PARA Graphie Charpentier B., H.-L. F. (2008). Guide du préparateur en pharmacie. Elsevier Masson

Agauriasalicifolia Hook.f ex Oliver, Agauriapolyphylla Baker (Ericaceae), Tambourissatrichophylla Baker (Monimiaceae) et Embeliaconcinna Baker (Myrsinaceae). Thèse de Doctorat. Toulouse

Amrouni, S., Touati, M., Hadeif, Y., & Djahoudi, A. (2014). Effect of Essential Oil of *Origanum vulgare* and *Thymus Ciliatus* against *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-2 Carbapenemase. *Phytothérapie*, 12, 309-313.

ANOFEL. (2014). Rapport annuel d'activité.(2014). Association Nationale des Observatoires de la Fécondité et de l'Épidémiologie des Leishmanioses

Avril J, L.Dabernat H, Denis F, Monteil H.(1992). Bactériologie clinique, 2ème édition, Ed., Marketing. Pp -268-276.

B

-**Badi Selma-Cheikh Imen, O. L. (2019).** Evaluation de l'activité antibactérienne d'extraits d'*Origanum vulgare*.

Baker, J. G., Centrella, J., Choi, D. I., Koppitz, M., van Meter, J. R., & Miller, M. C. (2006). Getting a kick out of numerical relativity. *The Astrophysical Journal*, 653(2), L93.

Balfour J H. (1860). A Manual of Botany. 702p.

Liste des références

- Bejaoui A., Chaabane H., Jemli M., Boulila AN., Boussaid M. (2013).** Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages. *Journal of Medicinal Food*. 16 (12) .1115–1120p.
- Belokurov, V., Zucker, D. B., Evans, N. W., Gilmore, G., Vidrih, S., Bramich, D. M., ... & Lupton, R. (2006).** The field of streams: *Sagittarius* and its siblings. *The Astrophysical Journal*, 642(2), L137.
- Ben Haj Khalifa A, Didier Moissenet, Hoang Vu Thien, Mohamed Khedher (2011).** Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations ; *Annales de biologie clinique*, 69 p : 399
- Benbouali, M. (2006).** Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de "*Mentha rotundifolia* et *Thymus vulgaris*". Magister, Génie chimique, Université Hassiba BEN BOUALI –CHLEF
- Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini A.F. & Costa J. (2008).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem*. 106: 132-139.
- Bleibtreu, A. (2016).** Déterminants de la virulence extra-intestinale de *Escherichia coli* : de la microbiologie à la clinique. ed : Elsevier .146 p : 1-7.
- Bouchaale Ikram Kahalerras Amira, Z. S. (2015).** Etude comparative de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Laurus nobilis* de deux régions (Algérie et Tunisie).
- Boumediou, A. & Addoun, S. (2017).** Étude ethnobotanique sur l'usage des plantes toxiques, en médecine traditionnelle, dans la ville de Tlemcen (Algérie). Université Abou Bekr Belkaïd. Faculté de médecine, Département de Pharmacie. Tlemcen. 119p.
- Bouzidi N., Aouni M., Touati A., Abbassi M.S. (2017).** « Distribution of virulence factors and their association with antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical.

Liste des références

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier, 2ème édition, Paris. 915p.

Burt R. S. (2004). « Structural Holes and Good Ideas », *American Journal of Sociology*, 110(2), p. 349-399.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.

C

Carson S. G., Madhok A., Wu T.(2006). « The interaction effect of relational norms and agent cooperativeness on opportunism in buyer-supplier relationships », *Journal of Business Research*, 59(12), p. 1218-1224.

Catty, S. (2001). Hydrosols: the next aromatherapy. *Inner Traditions/Bear & Co.ase*, 12(3), 123–134.

Chekouri, S. M., Chibi, A., & Benbouziane, M. (2015). Natural resource abundance and structural change', The Dutch disease in Algeria. *International Journal of Engineering Research and Management*, 2(2), 13-141.

Chen, Y. L., Analytis, J. G., Chu, J. H., Liu, Z. K., Mo, S. K., Qi, X. L., ... & Shen, Z. X. (2009). Experimental realization of a three-dimensional topological insulator, *Bi₂Te₃*. *science*, 325(5937), 178-181.

D

D, J. (1994). Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse, *Perfumer & Flavorist*. 5-17.

Dayal, B., & Purohit, R. M. (1971). Chemical examination of the essential oil from the seeds of *Majorana hortensis* Moench.

Delarras, C. (2014). Practical laboratory microbiology: research for bacteria and yeast-molds. Edition Céline Poiteaux, Paris, Tec& doc/Lavoisier, 800p.

Liste des références

Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M., & Roncalés, P. (2011). Antimicrobial activity of Pistacialentiscus and Saturejamontana essential oils against Listeria monocytogenes CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. Food control, 22(7), 1046-1053.

Dragana Miljaković., Jelena Marinković., Svetlana Balešević-Tubić. (2020).The Significance of Bacillus spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops

E

El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EA.(2015). Casabianca H, et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. Int J Pharm.;483(1-2):220–2

F

Fasty D. (2007). Ma bible des huiles essentielles. Leduc Editions. P : 20.

Fred .C, Tenorer .P. (2006). Mecanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Association for professionals in infections control and epidemiology. 48: 3-10.

G

G. Gessard, C. (1984) Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. Rev. Infect Dis. 6 Suppl 3: 775-776.

Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., & Portugal, H. (2004). Antifungal effects of various essential oils against Candida albicans. Phytotherapy Research, 18(12), 990–995.

Graser, A., Smith, J., & Muller, K. (1996). Title of the article in sentence case. Journal Name in Title Case, 12(3), 123–134.

H

Haddouchi, F., Lazouni, H. A., Meziane, A., & Benmansour, A. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de Thymus

Liste des références

fontanesii Boiss & Reut. *Afrique science: Revue internationale des sciences et technologie*, 5(2).

Hafiane, A., and Ravaoarino, M. (2008). [Various typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients]. *Med Mal Infect* 38: 238-247).

Hussain AI. (2009). Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae. Thèse en chimie. Université d'agriculture, Faisalabad, Pakistan. P: 134-144. *Indian journal of Natural Products and Resources*. 6(4). 261-267p.

K

Khireddine, Hamida. (2013). Comprimés de poudre de dattes comme support universel des principes actifs de quelques plantes médicinales d'Algérie, Mémoire de Magister, option : Technologie Alimentaire. Université Bougara-Boumerdes.

L

Lawless, H. T., Sheng, N., & Knoops, S. S. (1995). Multidimensional scaling of sorting data applied to cheese perception. *Food quality and preference*, 6(2), 91-98.

Lhuillier, A. (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauriasalicifolia* Hook. f. ex Oliver, *Agauriapolyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissatrichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embeliaconcinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de Doctorat. Toulouse

Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G. et Shao, Z. (2013). Diversité phylogénétique de la *Bacillepumilus* groupe et l'écotype marin révélé par analyse de séquence multilocus, *Plos Un* 8(11):11.

Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med . (1998). 339: 520–532.

M

Mahmodiyahia. (1990). La thérapeutique par les plantes les plus communes en Algérie. Palais de livre Brida. P 81

Liste des références

Marie-Cécile Péron .(2006). Désinfection microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation par les huiles essentielles

Maurice, N. (1997). L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Lavoisier, Paris, 12-14pp.

Mebarki N .(2010). Thèse de magistère. de chimie, Université –M'Hamed Bougara

Mérens A, Delacoura H, Plésiatb P, Cavalloc J, Jeannotb K.(2011). Pseudomonasaeruginosa et résistance aux antibiotiques. Rev : Francophone des laboratoires.Ed : Elsevier 435.p : 49

Morris A, Khettry A, Seitz EW .(1979). Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. J Am Oil Chem Soc 56: 595-603

N

Narishetty S., P. R. (2004). Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action, J. Control. Release, 95(3), 367-379

Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L. D., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals, 6(12), 1451–1474.

O

Owen, P. L., & Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. Journal of ethnopharmacology, 64(2), 149-160

P

P Jean-Marie Desjobert., I. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. Londres : 2ème Ed. Larousse.Pp : 143 et 225-226.

P Michelin Marie. (1987). Les Epices. Histoire, description et usage des différents El Asbahani

Liste des références

Paterson YL., Pittsburgh MD. (2006). Resistance in Gram negative bacteria: Enterobacteriaceae Association for professionals in infections control and epidemiology. 48: 20-28.

Paul Vos., George Garrity., Dorothy Jones., Noel R. Krieg., Wolfgang Ludwig., Jean-Pierre FACON, et Isabelle DESFORGES. (2022). groupe *Bacillus cereus* : microorganismes producteurs de toxines, persistants et nocifs dans l'industrie agroalimentaire

Ponce AG; Fritz R; Del Valle C; Roura SI. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Food Science and Technology 36, 679-684

Prescott.L, Harley. J, Klein.D.(2007). Microbiologie 2ème Ed., De Boeck. P: 520-582. research.10,618-627

R

Ratziu, V., Harrison, S. A., Francque, S., Bedossa, P., Lehert, P., Serfaty, L., ... & Gallegos-Orozco, J. (2016). Elafibranor, an agonist of the peroxisome proliferator activated receptor α and δ , induces resolution of nonalcoholic steatohepatitis without fibrosis worsening. Gastroenterology, 150(5), 1147-1159.

S

Schwartz, Beth, et al. (2024). "Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Settings: A Review of Resistance Mechanisms and Treatment Strategies." Pathogens 13.11 975

Sebai, M. & Boudali, M. (2012). Phytothérapie entre confiance et méfiance. République algérienne démocratique et populaire, ministre de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière, Institut de formation médicale, CHETTIA. Alger. 65p

Semra I., Benmerache A., Chibani S., Kabouche A., Abuhamdah S. & Kabouche Z.(2013). Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Origanum glandulosum* Desf. from Algeria. Der Pharmacia Lettre. 5(3): 381-385

Liste des références

Shellie R, et al.(2004). Quantitation of suspected allergens in fragrances (Part I): evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography for quality control. Flavour Frag

Sudbery, P. E. (2001). The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Molecular Microbiology*, 41 (1) 19_31

T

Talon D, Lallemand De Conto S, Thouverez M, Bertand .X, 2004. *Escherichiacoli*: résistance aux quinolones et aux bêta-lactamines des souches cliniques isolées en Franche Coté. Ed: Elsevier, France. 52 (2) : 76-81

Teixeira Duarte MC, Mara Figueira G, Sartoratto A, et al. (2005). Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharma- col* 97: 305-11

Teusher E., A. R. (2005). *Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles.* Paris: Tec & Doc 522.

Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., &Cheftel, J. C. (2003). High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13(6), 427-439.

Touwaide, A., & Conan, M. (2007). Art and Science: Private Gardens and Botany in the Early Roman Empire. *Botanical Progress, Horticultural Innovation and Cultural Change*, 37-49.

Tria, A. M., & Zenati, N. R. (2024). Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* vis-à-vis de souches responsables d'infections urinaires Université de Constantine, Algérie.

Trivers, R., Burt, A., & Palestis, B. G. (2004). B chromosomes and genome size in flowering plants. *Genome*, 47(1), 1-