République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
École Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطيةالشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'*Origanum glandulosum* vis-à-vis des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire et d'autres bactéries de référence

Présenté par : MEZIANE Aziza / NEZALI Sarah

Soutenu le : 28/09/2019

Devant le jury composé de:

- Présidente :	Mme ZENIA S	MAA (ENSV)
- Promotrice :	Mme DJELLOUT B	MAA (ENSV)
- Examinatrice 1:	Dr BOUZAGH T	MAA (ORAC)
- Examinatrice 2 :	Mme SAHRAOUI L	MAA (ENSV)

Année universitaire : 2018/2019

REMERCIEMENTS

Nos remerciements iront tout d'abord à notre promotrice **Mme DJELLOUT Baya,** MAA à l'ENSV pour nous avoir encadrée durant ce mémoire, pour ses conseils, sa bonne humeur, pour avoir été à notre écoute, ainsi que pour sa bienveillance mais aussi sa gentillesse tout au long de notre travail en sa compagnie.

Nous remercions également **Mme ZENIA S.** MAA à l'ENSV, pour avoir accepté de présider notre soutenance de fin d'études et **Mme SAHRAOUI L.** MAA à l'ENSV ainsi qu'au **Dr BOUZAGH T**. MAA et Directrice Technique auprès de l'ORAC pour leur aimable contribution à ce travail et d'avoir bien voulu faire partie de notre jury.

Dédicaces

Nous dédions ce travail à nos chers parents, à ceux qui ont fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui, vous êtes le meilleur cadeau de Dieu pour nous, on est chanceuses de vous avoir…

A nos sœurs Lynda et Yousra, vous êtes la preuve que le fait d'avoir une sœur, c'est d'avoir une armée derrière vous…

A notre Ilissa, tu es la force qui nous a poussé à avancer au cours des 5 dernières années avec ton humeur, ta bonté et ta douceur… tu es et tu resteras toujours précieuse à nos yeux.

Sarah & Aziza

Sommaire

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : Antibiorésistance des bactéries dans les élevages aviaires	**3**
I.1. Introduction	**3**
I.2. Les antibiotiques utilisés en élevage aviaire	**3**
I.3. Principales maladies bactériennes chez la volaille	**5**
Chapitre II : La phytothérapie	**6**
II.1. Définition	**6**
II.2. Phytothérapies traditionnelle et moderne	**6**
II.3. Phytothérapie en médecine vétérinaire	**7**
II.4. Présentation de la plante étudiée : *O. Glandulosum*	**7**
II.4.1. Aire de répartition	**7**
II.4.2. Description botanique	**8**
II.4.3. Classification botanique	**9**
II.4.4. Composition chimique	**9**
II.4.4.1. Les huiles essentielles	**9**
II.4.4.2. Les polyphénols totaux	**10**
II.4.4.3. Les flavonoïdes	**10**
II.4.4.4. Les tanins	**10**
II.4.4.5. Utilisation de l'origan	**10**
Chapitre III : Activité antibactérienne	**11**
III.1. Introduction	**11**
III.2. Mode d'action des huiles essentielles	**12**
III.3. Aperçu des techniques d'étude du pouvoir antimicrobien des HE	**13**

III.3.1. La méthode de l'aromatogramme	**13**
III.3.2. La méthode de diffusion en puits	**14**
III.3.3. La méthode de micro-atmosphères	**14**
III.3.4. Grandeurs de mesure des CMI et CMB	**15**

Partie expérimentale

I. Matériels	**16**
I.1. Critères et choix de la plante étudiée	**16**
I.2. Récolte, situation géographique, identification et conservation	**17**
I.3. Réactifs et appareils	**18**
II. Méthodes	**18**
II.1. Extraction de l'huile essentielle d'*O. glandulosum*	**18**
II.2. Calcul du rendement d'extraction en huile essentielle	**20**
II.2.1. Caractéristiques de l'huile essentielle d'*O. glandulosum*	**20**
II.3. Analyse physico-chimique de l'huile essentielle	**20**
II.3.1. Calcul du rendement d'extraction en huile essentielle	**20**
II.3.2. Densité relative	**20**
II.3.3. Indice de réfraction	**21**
II.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE d'*O.glandulosum*	**21**
II.4.1. Revivification des souches	**21**
II.4.2. Souches bactériennes testées	**22**
II.4.3. Analyse qualitative	**23**
II.4.3. Analyse quantitative	**24**
II.4.4.1 Détermination des CMI	**25**
II.4.2. Détermination des CMB	**26**

Résultats et discussion

I. Résultats des analyses physicochimiques de l'HE d'*O.glandulosum*	**27**
I.1.Extraction de l'huile essentielle	**27**
I.2.Rendement d'extraction	**27**
I.3. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle d'*O. glandulosum*	**28**
I.4.Indices physico-chimiques de l'huile essentielle d'*O. glandulosum*	**28**
I.4.1.Densité relative	**28**
I.4.2.Indice de réfraction	**29**
II. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'HE d'O.glandulosum	**29**
II.1. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne	**30**
II.2. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne	**34**
Conclusion et perspectives	**36**
Références bibliographiques	**37**
Annexe	

Liste des tableaux

Tableau1 : Principaux antibiotiques utilisés en élevage aviaire	4
Tableau 2 : Spectres des différentes molécules antibiotiques utilisées en filières avicoles**.**	4
Tableau3 : Classification botanique de *l'Origanum glandulosum* Desf.	9
Tableau4 : Réactifs et appareils	18
Tableau 5 : Souches microbiennes de référence ATCC	23
Tableau 6 : Rendement d'extraction de l'huile essentielle.	27
Tableau 7 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *l'O. glandulosum*	28
Tableau8 : Indices physicochimiques de l'HE de *l'O. glandulosum*	29
Tableau 9: Diamètre des zones d'inhibition de l'huile essentielle d'*O.glandulosum* vis-à-vis des antibiotiques testés.	31
Tableau 10 : Sensibilité des souches *d'E. coli* aviaires vis-à-vis de l'HE d'origan et des antibiotiques testés	33
Tableau 11 : CMI et CMB de l'HE d'*O.glandulosum* vis-à-vis des souches de référence	34
Tableau 12 : CMI et CMB de l'HE d'*O.glandulosum* vis-à-vis des souches aviaires	35

Liste des figures

Figure1. Illustration d'*Origanum glandulosum*	8
Figure2. Photo d'une plante d'*Origanum vulgare*	8
Figure 3. Illustration de la méthode de l'aromatogramme sur boite de pétri	14
Figure 4. Illustration de la méthode des micro-atmosphères	15
Figure 5. Protocole expérimental	16
Figure 6. Le site de récolte d'*Origanum glandulosum*	17
Figure 7. Dispositif d'hydrodistillation type Clevenger	19
Figure 8 : Distillat obtenu après décantation	19
Figure 9 : Milieu d'enrichissement BHIB avant et après incubation.	22
Figure10 : Boite de pétri après incubation.	22

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

ARN : acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine-Triphosphate

BHIB: Brain Heart Infusion Bouillon

CRD-SAIDAL : Centre De Recherche et De Développement SAIDAL

DMSO : Le diméthylsulfoxyde

ENS : Ecole Normale Supérieure

ENSA : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie

ENSV : Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

GMQ : gain moyen quotidien

HCl : l'acide chlorhydrique

HE : huile essentielle

IPA: Institut Pasteur Alger.

K+ : ions de potassium

KOH : Hydroxyde de potassium

pH : potentiel d'Hydrogène

SH : groupe sulfhydrile

T° : température

UV : ultra violet

Introduction

La résistance aux antibiotiques est devenue un problème majeur de santé publique en Algérie. En effet, ces dernières années ont été marquées par l'émergence et la dissémination de nouveaux gènes de résistance en particulier chez les bacilles à Gram négatif **(TANI et ARLET, 2014).**

En effet, l'utilisation excessive des antibiotiques en médecine humaine ainsi qu'en médecine vétérinaire et comme promoteurs de croissance dans les élevages industriels ont entraîné une résistance des bactéries pathogènes, rendant ainsi les traitements inefficaces **(ELHANI, 2011).** La recherche de nouveaux agents antibactériens est devenue une nécessité absolue.

A cet égard, les huiles essentielles (HE) obtenues à partir des plantes aromatiques pourraient remplacer ou renforcer les antibiotiques synthétiques usuels. En effet, ces huiles sont douées de nombreuses propriétés biologiques dont notamment antibactériennes et immunostimulantes **(BURT, 2004, BOUHDID *et al.*, 2012).**

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressé à évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle *d'Origanum glandulosum* sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire résistantes aux antibiotiques usuels. Le choix de cette plante, poussant à l'état spontané dans les monts de la région de Kadiria (Wilaya de Bouira) est basé sur son utilisation fréquente dans nos traditions locales culinaires et médicinales.

Le présent mémoire est structuré en deux parties :
La première partie de notre travail est consacrée à l'étude bibliographique qui comprend trois chapitres traitant de :

- l'antibiorésistance des bactéries dans les élevages aviaires
- La phytothérapie
- L'activité antibactérienne

La seconde partie expérimentale est axée sur :

- L'extraction de l'huile essentielle par le procédé d'hydrodistillation
- Des analyses physico-chimiques de l'huile essentielle extraite.

- Une étude biologique *in vitro* visant à évaluer le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle extraite. Les tests antibactériens sont réalisés sur 10 souches bactériennes d'*Escherichia coli* isolées des élevages avicoles.

Les résultats obtenus sont ensuite discutés. Le manuscrit est achevé par une conclusion suivie des perspectives.

Partie bibliographique

Chapitre I. ANTIBIORESISTANCE DES BACTERIES DANS LES ELEVAGES AVIAIRES

I.1.Introduction

Comme dans tous types d'élevage, l'utilisation des antibiotiques est primordiale dans les élevages avicoles :

- soit pour un objectif thérapeutique qui vise à l'éradication d'une infection présente (but curatif) ou la prévention d'une infection possible, à l'occasion d'un transport, d'une vaccination ou autre stress (but prophylactique) **(CHASLUS-DANCLA, 2001).**
- soit pour un objectif zootechnique ; les antibiotiques peuvent être utilisés comme facteurs de croissance, l'ajout de faibles doses de ces molécules dans l'aliment permet d'augmenter le gain moyen quotidien de poids (GMQ) des animaux ;ce qui contribue à diminuer le temps d'élevage. Cette pratique améliore également la valorisation de l'aliment en diminuant l'indice de consommation de quelques pourcents : il est alors possible de produire une plus grande quantité de viande avec la même quantité d'aliment. Enfin, Une plus grande homogénéité de poids est observée au sein des lots **(MATEO ,2016)**

I.2. Les antibiotiques utilisés en élevage aviaire

Les antibiotiques quelque soit leur origine naturelle, synthétique ou semi-synthétique peuvent être classés en fonction de leur spectre d'activité, mécanisme d'action, la voie de biosynthèse ou leur structure chimique **(PERRY *et al*., 2002).**

Leur usage en élevage aviaire présente deux types de risques :

- Présence de résidus dans la viande.
- Acquisition de résistances aux antibiotiques par les bactéries.

Les principaux antibiotiques utilisés ainsi que leurs spectres d'activités sont rapportés dans les tableaux 1 et 2

Tableau 1 : Principaux antibiotiques utilisés en élevage aviaire (MOGENET et FEDIDA, 1998) in (DOSSO,2014)

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques
Bétalactamines	Aminopenicillines : Ampicilline et Amoxilline Cephalosporines 3eme generation : Ceftiofur
Aminosides et apparentés	Dihydrostreptomycines(DHS), Gentamicine, Néomycine, Streptomycine, Spectinomycine, Framycetine
Quinolones	Acide oxolonique, Flumequine, Enrofloxacine, Difloxacine…etc
Tétracyclines	Chlorotetracycline, Oxytetracycline, Doxycycline
Polypeptides	Colistine (Polymixine E)
Macrolides	Erythromycine,Josamycine,Lincomycine,Tylosine,Tilmicosine,Spiramycine, Tiamuline, Tilmicosine
Sulfamides	Sulfadiazine, Sulfadimidine, Sulfadiméthoxine, Sulfaquinoxaline
Diaminopyrymidines	Triméthoprime

Tableau 2: Spectres des différentes molécules antibiotiques utilisées en filière avicole. (MOGENET et FEDIDA, 1998) in (DOSSO, 2014)

<table>
<tr><td>Très large</td><td colspan="2">Tétracyclines
- Staphylococcus - Streptococcus
- Entérobactéries - Pasteurelles
- Mycoplasmes - Clostridium
-Chlamydiaceae</td><td colspan="2">Sulfamides + Triméthoprime
- Staphylococcus
- Streptococcus
- Entérobactéries
-Pasteurelles</td></tr>
<tr><td>Large</td><td colspan="2">Pénicillines A
- Staphylococcus - Streptococcus
- Enterococcusfaecalis
-Clostridium - Entérobactéries
- Pasteurelles</td><td colspan="2">Fluoroquinolones
- Staphylococcus - Mycoplasmes
- Pseudomonas aeruginosa
- Entérobactéries
-Pasteurelles</td></tr>
<tr><td>Plutôt large</td><td colspan="4">Aminoglycosides
- Staphylococcus - Entérobactéries – Pasteurelles</td></tr>
<tr><td>Etroit</td><td>Macrolides
-Staphylococcus
- Streptococcus
- Clostridium
- Mycoplasmes
- Chlamydophila</td><td>Lincosamides
- Staphylococcus
- Streptococcus
- Clostridium
- Mycoplasmes</td><td>Quinolones
-Entérobactéries
-Pasteurelles</td><td>Pénicilline
-Staphylococcus
- Streptococcus
- Clostridium
- Pasteurella multocida</td></tr>
<tr><td>Restreint</td><td colspan="2">Colistine
- Entérobactéries - Pasteurelles
- Salmonella enterica - Pseudomonas aeruginosa</td><td colspan="2">Tiamuline
- Staphylococcus aureus
- Streptococcus
- Mycoplasmes</td></tr>
</table>

I.3. Principales maladies bactériennes chez la volaille

Plusieurs maladies d'origine bactérienne peuvent affecter les élevages aviaires et causer des pertes économiques ; les plus courantes sont :

- La pasteurellose ou cholera aviaire, infections à *Pasteurella multocida.* C'est une maladie infectieuse affectant plusieurs espèces d'oiseaux rencontré dans le monde entier, sous forme sporadique ou enzootique, aiguë ou chronique **(VILLATE, 2001)**
- Les salmonelloses sont causées par les entérobactéries du genre *Salmonella***,** Il existe des sérotypes motiles entraînant des paratyphoïdes, et des sérotypes non motiles pouvant entraîner la pullorose ou la fièvre typhoïde.
- Les mycoplasmoses aviaires sont causées principalement par les bactéries du genre *Mycoplasma***.** Ce sont des infections respiratoires, génitales ou articulaires. Ce sont des maladies insidieuses, courantes, qui ont néanmoins régressé ces dernières années, suite aux efforts d'éradication dans les troupeaux reproducteurs. Elles entraînent de lourdes pertes économiques
- Les infections à *Staphylococcus aureus* sont des infections qui se manifestent surtout au niveau locomoteur. Elles sont responsables de baisses des performances zootechniques, de saisies à l'abattoir et de toxi-infections alimentaires **(VILATTE, 2001)**
- Les colibacilloses sont causées par *Escherichia coli* . Elles sont sans doute les infections bactériennes les plus fréquentes et les plus importantes en pathologie aviaire. Elles peuvent entrainer de la mortalité, des baisses de performances et des saisies à l'abattoir. Contrairement aux infections des mammifères, les colibacilloses aviaires prennent des formes générales, avec une voie d'entrée respiratoire ou génitale. La plupart des colibacilloses sont des surinfections, à la suite d'infections virales ou bactériennes (mycoplasmes respiratoires notamment).

Durant ces dernières années, ces infections ont été reconnues comme principale cause de morbidité, de mortalité et de condamnations chez les poulets et les dindes. L'incidence et la gravité des infections dues aux coliformes ont augmenté rapidement causant ainsi des pertes économiques importantes dans les élevages **(ZANELLA *et al.*, 2000).**

Chapitre II. PHYTOTHERAPIE

L'utilisation des plantes a été pendant plusieurs siècles la seule méthode pour se soigner. Aujourd'hui encore, de très nombreux médicaments sont fabriqués à base de plantes dans le but de réduire les effets secondaires des médicaments chimiques et les temps d'attentes nécessaires après l'administration des différents médicaments à usage vétérinaire ainsi que l'accoutumance.

II.1.Définition

On appelle « phytothérapie » la thérapeutique par les plantes (du grec phyto : plante, et therapeia : soin). C'est l'emploi de médicaments végétaux pour soigner les différents maux dont nous pouvons être victime. On utilise ainsi fleurs, feuilles, racines voire plantes entières, mises en œuvre sous forme de tisanes, de gélules et d'extraits **(SCIMECA et TETAU, 2005; MATHIEU et FONTENEAU, 2008).**

II.2. Phytothérapies traditionnelle et moderne

La phytothérapie traditionnelle se base sur l'expérience sans aucune base scientifique « l'approche traditionnelle revêt un caractère « intégral », « global » qui l'éloigne de l'approche médico-scientifique occidentale actuelle qui, elle, tend davantage à la purification, à l'isolement des substances et à l'identification précise des mécanismes d'action pharmacologique sur des récepteurs, des cellules ou des organes. Il n'en demeure pas moins que cette approche offre une échelle d'observation inégalée, tant sur la durée que pour le nombre de sujets » **(CARILLON, 2009).**

Au cours des années, le développement de la chimie a donné naissance à la phytothérapie moderne qui se repose sur l'étude des plantes médicinales dans le but de déterminer les mécanismes d'action conduisant les propriétés thérapeutiques concédées par l'usage traditionnel, et d'utiliser des produits d'extraction ou de synthèse pour une activité plus importante et reproductible. L'acquisition de ces informations a permis d'avoir une meilleure efficacité et moins de facteurs de risque.

« Une phytothérapie « moderne ». Celle-ci intègre les données ancestrales et au niveau scientifique, elle tient compte des mécanismes de synergie des différents constituants d'une même plante et des plantes entre elles, ainsi que des réactions physiologiques cliniques qu'elles provoquent sur un individu donné » **(CARILLON, 2009).**

II.3. Phytothérapie en médecine vétérinaire

Des remèdes à base de plantes ont été utilisés par les propriétaires d'animaux et les vétérinaires, cependant, la phytothérapie vétérinaire à base scientifique et axée sur les espèces est encore au stade de développement. C'est pour ca qu'il est nécessaire d'adapter les connaissances approfondies de la recherche en phytothérapie médicale humaine pour la pratique vétérinaire.

Les médicaments à base de plantes sont rarement utilisés dans les infections des yeux et des oreilles ainsi que dans les endo-parasitoses et les ecto-parasitoses, mais plus souvent dans les maladies du foie, des articulations, des reins, du cœur et de la peau. Généralement, les phyto-drogues sont plus fréquemment appliquées dans les maladies chroniques ainsi comme des médicaments secondaires, dans des cas où le temps de traitement dépasse généralement un mois.

Les indications approuvées pour la phytothérapie sont les maladies respiratoires (secrétolytiques, sécrétomoteurs), les troubles gastro-intestinaux (spasmolytiques, carminatifs, laxatifs, anti-diarrhéiques, thérapeutiques des ulcères), les eczémas, les dermatoses, les plaies (nettoyage des plaies, granulation stimulante), l'insuffisance hépatobiliaire (cholérétique, cholagogues), troubles du système cardiovasculaire, surmenage du système locomoteur, convalescence , inflammations des muqueuses, inflammations du tractus urogénital ainsi que des conditions d'excitation (sédatifs). Dans la pratique des équidés et des petits animaux, la phytothérapie répond à la demande croissante des propriétaires d'animaux pour des méthodes de traitement douces «naturelles». L'absence du temps d'attente est importante dans le traitement des grands animaux. **(SCHULZ et HANSEL, 2008)**

II.4.Présentation de la plante étudiée :*Origanum glandulosum*

Le nom «*Origanum* » vient du grec « *Oros* »= montagne, et « *Ganos* »= joie, l'origan est donc considéré comme la joie ou l'ornement des montagnes.

II.4.1.Aire de répartition

Origanum glandulosum, est une plante spontanée endémique qui pousse au nord de l'Afrique (Algérie et Tunisie) **(IETSWAART, 1980) ;** Très commune dans les endroits secs et

ensoleillés tel que le Tell, elle pousse depuis le niveau de la mer jusqu'à 4000 m d'altitude, principalement sur les substrats calcaires **(BABA AISSA, 1990).**

II.4.2.Description botanique

L'origan est une herbacée vivace de 30 à 60 cm de hauteur, au feuillage et aux fleurs très odorants quand on les froisse. Elle est ainsi reconnaissable à son odeur et à sa saveur phénolée, épicée et chaude **(ARVY et GALLOUIN, 2003 ; TEUSCHER *et al*., 2004).**

Les tiges dressées, souvent rougeâtres et velues, portent les feuilles ovales opposées et espacées. Celles-ci possèdent des glandes sécrétrices sessiles non apparentes. Les fleurs blanches ou rose sont groupées en inflorescences. Chaque fleur est située à l'aisselle d'une bractée ovale, et dépassant le calice. Ce calice est lui-même en tube gamosépale et persistant. La corolle, plus grande que le calice, est quant à elle bilabiée à tube saillant à la base et gamopétale. Le fruit est constitué d'akènes. La floraison se prolonge de mai à octobre **(BABA AISSA, 1990 ; TEUSCHER *et al*., 2004 ; FIGUEREDO, 2007).**

Selon **QUEZEL et SANTA (1963)**, l'origan est une plante herbacée, ou sous ligneuse à la base, à tige toutes dressée épis denses ; à fleurs restant contiguës après la floraison. La corolle de couleur blanchâtre à lèvre inférieure bien plus longue que la lèvre supérieure calice non bilabié à 5 dents subégales, avec un épi linéaire glabre ou faiblement pubescent (figure 1).

Figure1. Illustration *Origanum Vulgare* **(wikipedia)** **Figure2.** Photo d'une plante *d'Origanum vulgare* **(aromatic studies.com)**

D’après Quezel et Santa (1963), seulement trois espèces du genre *Origanum*, sont répertoriées au niveau du territoire Algérien à savoir: *Origanum majorana L, Origanum glandulosum Desf* et *Origanum floribundum Mundy*.

II.4.3.Classification botanique

La classification botanique de la plante étudiée est rapportée dans le tableau 3.

Tableau3. Classification botanique d’*Origanum glandulosum* Desf. (GUIGNARD, 2001) :

Règne	**Végétal**
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotyledone
Sous classe	Astéridae
Ordre	Lamiales
Famille	Labiées
Genre	Origanum
Espèce	*Origanum glandulosum*

II.4.4.Composition chimique

II.4.4.1.Les huiles essentielles

L’étude phytochimique d’*Origanum glandulosum* de la région de Sétif en Algérie montre que les huiles essentielles de cette plante présentent de fortes teneurs en carvacrol (47 %), suivi de g-terpinéne (13,4 %), de p-cyméne (11,2 %) et de thymol (6,6 %) **(BELHATTAB R., *et al.*, 2005)** Par ailleurs, les analyses chromatographiques effectués par RUBERTO *et al.,* 2002. sur les huiles essentielles d’O*riganum glandulosum*, récolté dans quatre stations différentes dans la région de Sétif (Algérie), signalent la présence de deux chimiotypes : chimiotype à thymol et chimiotype à carvacrol, suivi de p-cyméne (3,6-25,8 %) et de g-terpinéne (4,8-13,2 %). L’importante activité de l’huile essentiale d’O*riganum*

glandulosum Desf est due à sa richesse en phénols (carvacrol et thymol…..) **(BENDAHOU *et al.*, 2008).**

II.4.4.2.Les polyphénols totaux

Molécules organiques caractérisés par la présence d'au moins deux groupes phénoliques, ce sont les produits de métabolisme secondaire des plantes.

L'origan est une herbe aromatique importante, riche en composés phénoliques avec une forte activité antioxydante et antibactérienne **(SAGDICET., 2003 ; CAPECKA *et al* .2005).**

II.4.4.3.Les flavonoïdes

Ils forment une sous classe des polyphénols responsables de la couleur des fleurs et des fruits, ils sont des métabolites secondaire caractérisés par la même structure de base : deux cycles aromatiques reliés par trois carbones. Les flavonoïdes représentent une source importante d'antioxydant dans notre alimentation.

Selon **SKERGET *et al.*, (2005),** le genre *Origanum* possède des flavonoïdes avec teneurs variables à savoir la quercetine, l'apigenine et la myricetine.

II.4.4.4.Les tanins

Substances végétales de la famille des polyphénols, ils sont des métabolites secondaires utilisés par les plantes supérieures comme un antibactérien à cause de leur capacité de précipiter des protéines, des polysaccharides et alcaloïdes à partir de leur solution aqueuse.

L'*Origanum vulgare L* contient des tanins dont la teneur est estimée à 2,53 mg / g de pro- anthocyanidines **(HADI, 2004).**

II.4.5.Utilisation de l'origan

L'origan ou « zaâter » ; comme il est appelé en Algérie ; est utilisé dans les préparations culinaire et médicinale, il est considéré comme remède pour les maladies sévères tels que la toux et les affections respiratoires. En effet, cette plante expectorante, stomachique, stimulante, tonique possède des propriétés antiseptiques, antispasmodiques et antitussives **(BABA AISSA ,1999 ; SIJELMASSI, 1991).** Les espèces d'*Origanum* sont utilisées également comme des désinfectants puissants et comme des agents odoriférants dans les parfums **(CHIEJ, 1984)**.

Chapitre III : ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

III.1. Introduction

L‘activité antimicrobienne des huiles essentielles est liée principalement à leurs compositions chimiques et particulièrement à la nature de leurs composés majoritaires. Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles **(CARSON et RILEY, 1995)** ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif **(PEREZ *et al.*, 1999 ; LIS-BALCHIN *et al*., 2001).**

En effet, le pouvoir microbicide *in vitro* de certaines huiles essentielles a même été prouvé supérieur à celui de certains antibiotiques **(VALNET *et al.*, 1978)**. Par ailleurs, bien qu‘il soit admis que l‘activité antimicrobienne des huiles essentielles se classe dans l‘ordre décroissant suivant la nature des composés majoritaires (Phénol >alcool >aldéhyde >cétone>oxyde>hydrocarbures>esters **(LEE *et al.*, 1971)**, l‘effet des composés minoritaires n‘est parfois pas négligeable **(TANTAOUI *et al.* 1993).**

Parmi les travaux de recherche qui ont mis en valeur cet effet antimicrobien des huiles essentielles se trouvent:

- **DIDRY *et al.*, (1993)** *a* mis en évidence l‘effet antimicrobien du thymol et du carvacrol, utilisé individuellement ou en combinaison sur des germes d‘infection respiratoire.
- **JUVEN *et al., (*1994)**ont montré que l‘huile de thym et ses constituants actifs détruisent les cellules vivantes de *Salmonella thyphimirum*.
- Selon **VRINDA MENON et GARG, (2001)**,les huiles essentielles du clou de girofle, d'origan et du thym sont efficaces contre *Listeria monocytogenes* à une dose de 5-10µl/g dans des produits à base de viande.
- **PEREZ *et al.*, (1999)** ont reporté l‘action inhibitrice des huiles essentielles de *Senecio graveolens* et de ses constituants sur des isolats cliniques de *Candida albicans*.
- **ARRAS et USAI, (2001)**, ont prouvé l‘effet fongitoxique du carvacrol, composé majoritaire de *Thymus capitatus* sur le champignon *Penicillium digitatum*.
- L‘effet antiviral des huiles essentielles d‘origan et du girofle sur le virus Type1‘herpès simplex ainsi que sur le virus de la maladie de Newcastle a été démontré **(SIDDIQUI *et al.*, 1996).**

III.2. Mode d'action des huiles essentielles

Vu la variabilité chimique (quantitative et qualitative) des huiles essentielles, leur mécanisme d'action sur les microorganismes reste encore peu intelligible. Du fait de cette variabilité, il est fort probable que chacun des constituants ait son propre mécanisme d'action **(RHAYOUR, 2002)** et que leur activité antimicrobienne soit attribuable à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire **(BAJPAI et KANG, 2010).**

Toutefois, la plupart des travaux réalisés montrent que l'action des huiles essentielles se déroule d'une manière générale en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne : ceci provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires. Le caractère lipophile des huiles essentielles leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane cellulaire. Cela induit une fuite d'ions (K+) suite à une perturbation chemo-osmotique (**COX *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*,2006)**.
- Acidification de l'intérieur de la cellule : Une fois pénétrée dans la cellule, l'huile essentielle acidifie le milieu (baisse du pH) bloquant ainsi la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure. **ULTEE *et al.*,(1999)** ont montré que le carvacrol provoque chez *bacillus cereus* une diminution de l'ATP intracellulaire, ainsi qu'une réduction du potentiel membranaire et du pH intracellulaire. Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATP ase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP **(KNOBLOCH *et al.*, 1989; SIKKEMA *et al.*, 1995).** En sus, une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez E*nterobacter aerogenes* a aussi été rapportée **(WENDAKOON et SAKAGUCHI, 1995).**
- Destruction du matériel génétique : les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des polysaccharides. Les huiles essentielles hydroxylées pourraient créer des perturbations enzymatiques au niveau du mésosome qui participe à la séparation du matériel nucléaire au cours de la division cellulaire **(MALECKY, 2007).**
- L'activité inhibitrice des huiles essentielles serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire **(MALECKY, 2007).**

III.3. Aperçu des techniques d'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne in vitro, peut être déterminée par plusieurs méthodes soit en milieu liquide ou solide. La mise en évidence de cette activité est conditionnée par le caractère hydrophobe des huiles essentielles, leur volatilité ainsi que la nécessité de les tester à de faibles dosages. De ce fait, certaines de ces méthodes recourent à l'utilisation de divers dissolvants tels que l'acétone, l'éthylène-glycol **(SU *et al.*, 2006)**, l'éthanol **(CHANG *et al.*,2008),** le méthanol **(ARMANDO et RAHMA, 2009),** le DMSO **(AHMED et ABDELGALEIL, 2005),** ou l'emploi d'un émulsifiant comme le Tween 20 ou le Tween 80 **(FU *et al.*,2007; CAPLIN *et al.*,2009)**.

Ceci afin de solubiliser l'huile essentielle et de lui permettre une dispersion homogène dans le milieu de culture: diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon **(BURT, 2004).**

III.3.1.Méthode de l'aromatogramme

C'est une méthode dont le principe est équivalent à celui d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles. Elle consiste à faire couler dans des boites de pétri le milieu de culture gélosé (10 à 25ml), inoculé de la souche microbienne à tester (ensemencement en surface). Une fois solidifié, des disques en papier filtre, ou papier buvard dont le diamètre peut aller de 6 à 10 mm, imprégnés de l'huile essentielle préalablement sélectionnée sont soigneusement déposés sur la gélose déjà ensemencée **(TRAORE, 2006)**.

Après incubation, les colonies se développent sur toute la gélose sauf autour des disques où des zones vierges se contrastent (pas de développement de colonies), appelées zones d'inhibition (figure 3) et qui sont dues à l'effet antimicrobien exercé par l'HE sur la souche ensemencée. Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à l'activité antimicrobienne de l'huile sur le germe testé. Enfin, pour exprimer cette activité il suffit de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition en mm (pied à coulisse) **(GUERIN et CARRET, 1999).**

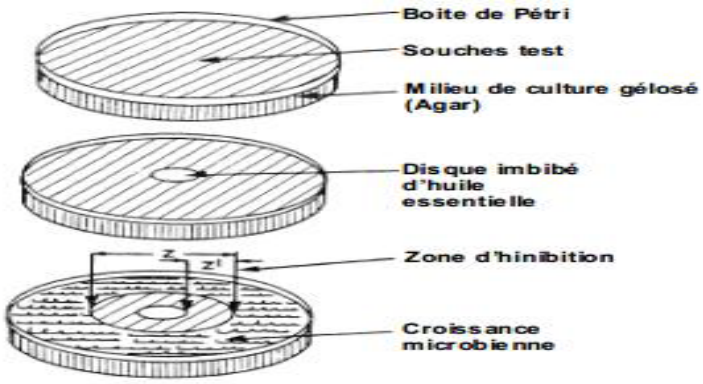

Figure 3: Illustration de la méthode de l'aromatogramme sur boite de pétri **(ZAIKA, 1988)**

III.3.2. Méthode de diffusion en puits

Cette méthode est similaire à l'aromatogramme où l'on procède de la même manière pour l'ensemencement de la souche microbienne. Mais au lieu de déposer les disques en papier, des petits trous circulaires sont effectués directement au niveau de la gélose puis remplis d'un volume donné d'huile essentielle.

Après incubation, des zones d'inhibition circulaire apparaissent suite à la diffusion radiale de l'huile essentielle dans la gélose. La mesure des zones s'effectue comme déjà cité dans la première méthode **(EYMARD, 2003;WILKINSON, 2006).**

III.3.3.Méthode de micro-atmosphère

Dans cette méthode, seule l'activité antimicrobienne des constituants volatils (faible poids moléculaire) de l'HE est mesurée. Elle a un protocole techniquement presque analogue à celui de l'aromatogramme. La différence réside seulement dans la position du disque en papier. Dans cette méthode, les disques imprégnés de l'huile essentielle ne sont pas au contact de la gélose. Ils sont placés au centre du couvercle de la boite de pétri renversée durant toute la durée de l'expérimentation (figure 4).

Les substances volatiles de l'huile essentielle se propagent dans le milieu gélosé et exercent leur activité antimicrobienne sur le germe ensemencé. Après incubation, on procède à la mesure des zones d'inhibition **(LAHLOU, 2004 ; BASER et BUCHBAUER, 2010).**

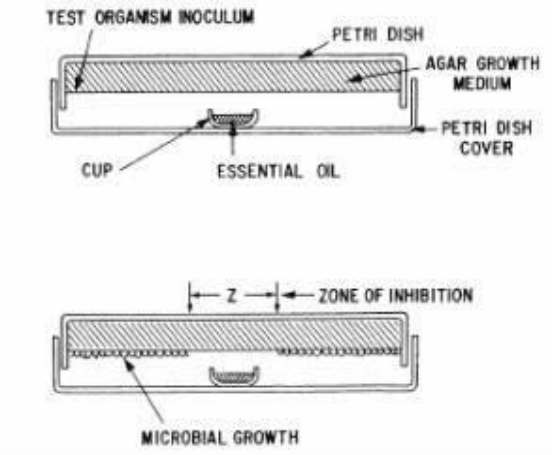

Figure 4: Illustration de la méthode des micro-atmosphères **(ZAIKA, 1988)**

III.3.4.4.Grandeurs de mesures des CMI et CMB

La détermination de ces deux concentrations est indispensable pour la précision de l'étude de l'activité antimicrobienne.

La CMI de façon générale est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 48 heures **(HILAN *et al.*, 2009).**

La CMI n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur. Ceci a amené à définir un autre paramètre la concentration minimale bactéricide (CMB) parfois appelé aussi létale (CML) **(DAVIDSON et PARISH., 1989).**

Partie expérimentale

L'objectif de ce travail est une contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire et d'autres bactéries de référence vis à vis de l'huile essentielle de *l'Origanum glandulosum.*

Plusieurs tests ont été réalisés, nous les résumons dans la figure suivante (figure 5).

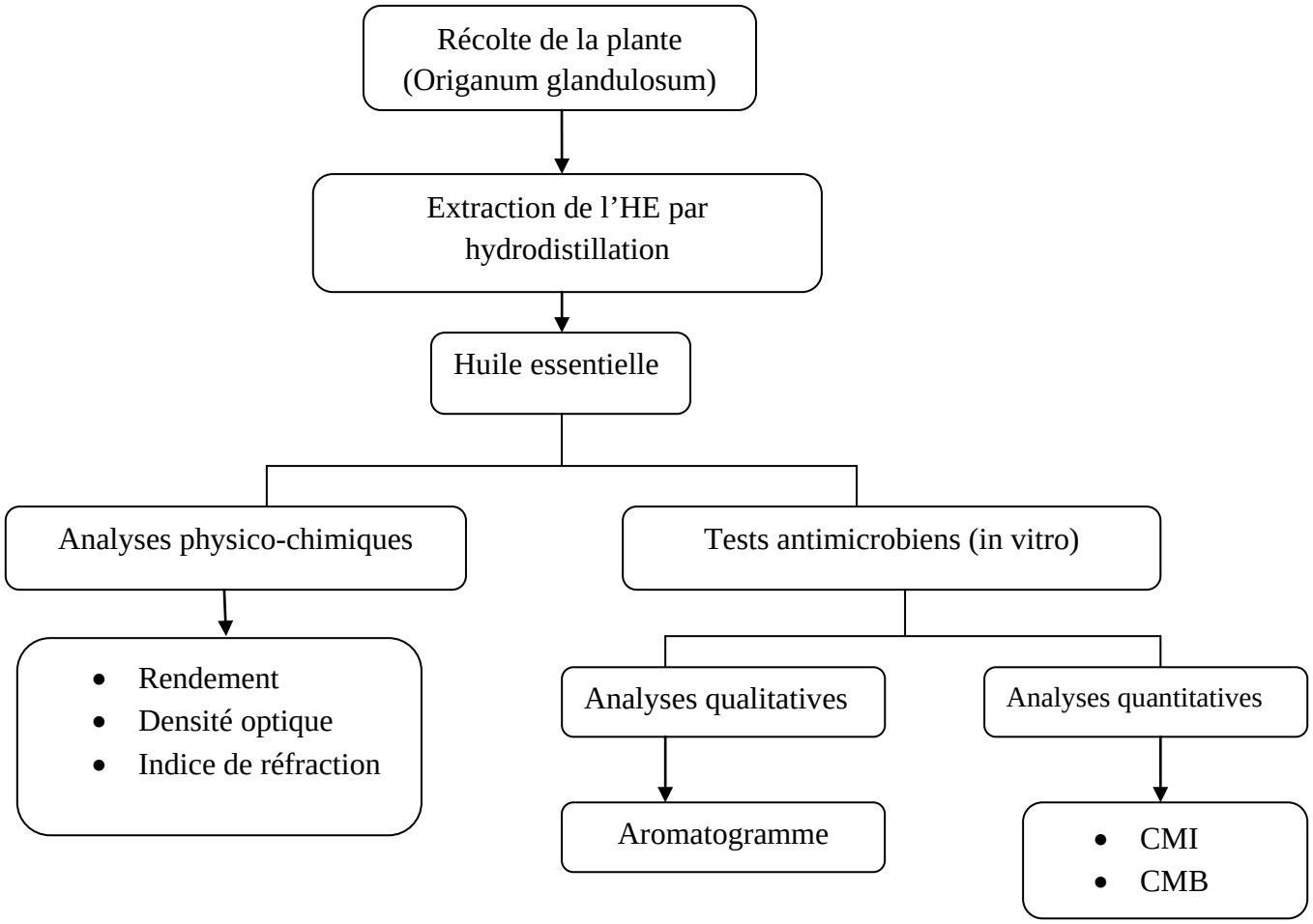

Figure 5 : Protocole expérimental

I. Matériels

I.1. Critère et choix de la plante étudiée

Pour la valorisation de la médecine traditionnelle et vu l'importance de la biodiversité de notre patrimoine floral, nous nous sommes intéressé à la plante : *Origanum glandulosum de la* famille des Lamiacées. Le choix de cette plante est basé sur une étude bibliographique ayant révélé une utilisation fréquente de la plante en médecine traditionnelle.

Ainsi, les critères de sélection de la plante qui constitue l'objet de notre étude sont les suivants :

- Abondance de la plante dans notre région d'étude.
- Utilisation traditionnelle dans le traitement des maladies d'origine microbienne.
- La non toxicité de la plante, vu qu'elle est utilisée dans les préparations culinaires et dans les tisanes.
- Sa richesse en substances aromatiques (huiles essentielles) et polyphénols.

I.2.Récolte, situation géographique, identification et conservation

Les échantillons de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) *d'Origanum glandulosum*ont été récoltés au mois de février 2018, au stade de floraison, où il y'a accumulation importante des substances bioactives, ont été récoltées tôt le matin (8h) dans la localité de Beni – Maânad ; la daïra de Kadiria, Wilaya de Bouira (Est d'Alger**)** à 600m d'altitude **(Figure 6).** Le climat est de type méditerranéen avec un sol sec et rocailleux.

Figure 6 : Le site de récolte d'*Origanum glandulosum* (photo originale)

L'identification botanique a été réalisée selon la classification de **QUEZEL et SANTA (1963)**, et par les botanistes de l'ENSA conformément à l'herbier mis en place au laboratoire de Botanique. La plante a été débarrassée des impuretés, ensuite elle a été mise à sécher à l'ombre à une T° ambiante de 20-25°C.

I.3. Réactifs et appareils

Les réactifs et les appareils utilisés durant la partie expérimentale sont consignés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Réactifs et appareils

Activité	Réactifs	Appareils
Extraction de l'HE	L'eau distillée	Balance de précision (KERN) Mixeur Hydrodistillateur type Clevenger,
Densité relative 20°C	Ethanol Eau distillée	Un pycnomètre Une étuve Une balance de précision
Indice de réfraction 20°C	Ethanol Eau distillée	Un réfractomètre (ABBEE) Un thermomètre.
Activité antimicrobienne	Milieux de cultures (Composition détaillée en annexe) : *Mueller-Hinton (MH) Bouillons nutritifs: TSA (trypticase soja agar), TSB (trypticase soja bouillon),	Bain marie Etuve chambre à UV flacon (200 ml), boites de pétri (9 cm) disques en papier absorbant (9 mm) pipettes pasteurs,

II. Méthodes

II.1.Extraction de l'HE d'*Origanum glandulosum*

L'huile essentielle *d'O. glandulosum* est obtenue par la méthode d'hydrodistillation, dans un appareil de type Clevenger.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée au niveau du laboratoire d'Agronomie de l'ENS «Kouba ». L'opération consiste à introduire 100g de masse végétale séchée dans un grand ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis

dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée (**Figure 7).** L'opération d'extraction dure deux heures à partir du début d'ébullition **(BOUHADDOUDA, 2016).**

Figure 7 : Dispositif d'hydrodistillation type **Clevenger**

La décantation du distillat se fait à l'aide d'une ampoule à décanter, laisser le distillat décanter jusqu'à l'observation de deux phases (figure 8) :

- ✓ La phase supérieure (huile essentielle).
- ✓ La phase inférieure (l'hydrolat).

Figure 8 : Distillat obtenu après décantation (photo originale)

L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière**.**

Récupérer la couche de l'huile essentielle dans des flacons en verre, puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile.

Enfin l'HE est récupérée, pesée puis conservée dans des flacons opaques bien scellés à une T° de +4°C.

II.2.Calcul du rendement d'extraction en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle, se définit comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle (M_{HE}) et la masse de la matière végétale sèche dont cette huile est extraite (M_S) **(AFNOR, 2000)**. Il est donné par la formule suivante :

$$R_{HE(\%)} = M_{HE}/M_S \times 100$$

$R_{HE(\%)}$: rendement en huile essentielle exprimée en g /100g de matière sèche.
M_{HE}: masse de l'huile essentielle obtenue (g).
M_S: masse de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction (g).

II.2.1. Caractéristiques de l'huile essentielle d'*O. glandulosum*

La caractérisation d'une essence consiste à déterminer la couleur, la saveur et l'odeur.

II.3. Analyses physico-chimiques de l'huile essentielle

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de norme de l'Association française de Normalisation **(AFNOR, 2000).**

II.3.1.Calcul du rendement d'extraction en huile essentielle

Afin de caractériser l'huile essentielle extraite nous avons procédé à plusieurs mesures : le rendement, la densité relative et l'indice de réfraction au niveau du laboratoire de Biochimie médicale de l'ENSV selon la norme **AFNOR (2000)**.

II.3.2. Densité relative à 20° C (D20)

Mode opératoire

-Nettoyer soigneusement le pycnomètre, le rincer avec de l'éthanol et le sécher à l'étuve.

-Après avoir noté le poids du pycnomètre vide, y verser un volume précis d‘eau distillée. L‘ensemble est ensuite pesé sur une balance de précision.

-Après séchage et refroidissement du pycnomètre, effectuer les mêmes opérations en remplaçant l‘eau par notre huile essentielle.

II.3.3. Indice de réfraction

Mode opératoire

L‘utilisation du réfractomètre requiert de régler celui-ci par l‘une des solutions étalon dont l‘indice de réfraction est préalablement connu telle que : eau distillée dont l‘indice de réfraction est de 1.333 à 20°C.

Une fois l‘appareil réglé, verser une goutte d‘huile essentielle sur le prisme et prendre la mesure. L‘appareil affiche un indice à la T° ambiante préalablement notée.

II.4. Evaluation de l’activité antimicrobienne de l’huile essentielle d’O. *glandulosum*

Cette analyse a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie de l’ENSV. Cette analyse se déroule en deux étapes : analyse qualitative et analyse quantitative.

II.4.1. Revivification des souches

- **Enrichissement**
  - L’enrichissement a été fait sur bouillon nutritif et BHIB
  - La pipette pasteur est passée rapidement dans la flamme.
  - On fait introduire la pipette pasteur dans le tube contenant les souches déjà isolées de façon à suivre le trajet initial puis on la plonge directement dans le bouillon nutritif ou le BHIB.
  - Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.

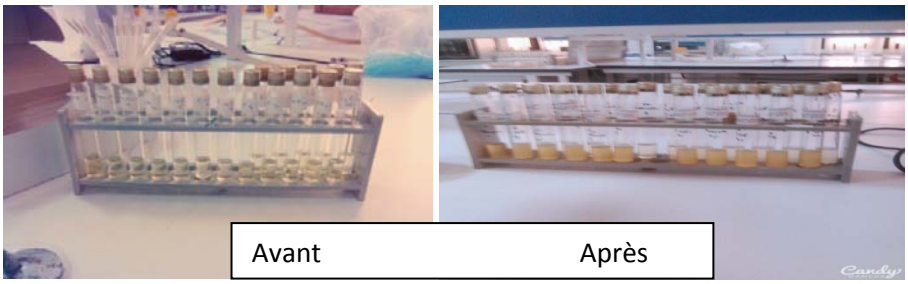

Figure 9 : Milieu d'enrichissement BHIB avant et après incubation (photos originales).

❖ **Isolement**

- L'isolement a été fait sur gélose nutritive.
- Stériliser l'anse de platine en le portant au rouge dans la flamme du bec benzène, le laisser refroidir dans la zone stérile.
- Prélever et repiquer rapidement dans le bouillon nutritif.
- Ensemencer par stries fines et très serrées le premier demi-cercle.
- Flamber l'anse de platine et laisser refroidir.
- Ensemencer le deuxième demi-cercle.
- Mettre à incuber à 37°C pendant 24h.

Figure10 : Boite de pétri après incubation.

II.4.2.Souches bactériennes testées

- 10 Souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire.

Les souches proviennent d'élevages aviaires (prélèvements du cloaque) .Les prélèvements ainsi réalisés sont identifiés (date et site de prélèvement), puis acheminés vers le laboratoire de microbiologie de l'IPA pour isolement sur milieux sélectifs puis identification biochimique API 20 E. Les souches identifiées sont conservées en gélose profonde dans des tubes de conservation à T° ambiante.

- Les souches microbiennes de référence ATCC (American Type Culture Collection) testées proviennent de la collection du CRD-SAIDAL, elles sont rapportées dans le tableau 5.

Tableau 5: Souches microbiennes de référence ATCC

Bactéries	Gram +	*Staphylococcus aureus* **ATCC 6538**	*Bacillus subtilis* **ATCC 9372**
	Gram -	*Escherichia coli* **ATCC 4157**	*Pseudomonas aeruginosa* **ATCC 4352**

II.4.3.Analyse qualitative

Basée sur le principe de l'aromatogramme, elle permet la mise en évidence d'une éventuelle activité antimicrobienne (par la mesure des zones d'inhibition) des différents extraits en contact avec le germe ciblé. La concentration de ce dernier est ajustée à 10^7-10^8 germe/ml.

Pour notre cas, nous avons adopté une méthode modifiée et validée par le laboratoire de microbiologie de CRD-SAIDAL. Celle-ci est tirée de la méthode de titrages des antimicrobiens de la pharmacopée européenne.

- **Préparation de la première couche du milieu**

Dans un bain marie réglé à 95°C, faire liquéfier le milieu Mueller-Hinton. Verser ensuite dans des boites de pétri (9cmØ) la première couche de chaque milieu à raison de 15ml par boite et les laisser refroidir. L'opération a été répétée deux fois pour chaque souche.

- **Préparation de l'inoculum :** A partir d'une jeune culture (16 à 18h), prélever aseptiquement à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies isolées et les introduire dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique stérile. Le tube est porté au vortex pour une meilleure répartition de la souche dans l'eau physiologique.

  La concentration de la suspension microbienne prévue pour l'ensemencement doit être fixée au préalable à 10^7-10^8 germe /ml en utilisant un spectrophotomètre réglé à une

longueur d‘onde de 620nm. La densité optique (DO) qui correspond à cette concentration est de 0,2 à 0,3 pour les bactéries sauf pour *Staphylococcus aureus* (qui est de 0,03 à 0,04).

- **Préparation de la deuxième couche du milieu**

Verser le milieu de culture (Mueller-Hinton) dans un flacon à raison de 50ml additionné de 200µl de la suspension microbienne et l‘agiter énergiquement pour que les germes soient bien répartis dans le milieu. Verser ensuite aseptiquement la deuxième couche du milieu dans les boites de pétri sur la surface de la première couche déjà solidifiée.

- **Dépôt de disques**

Les disques en papier absorbant (9mm) stérilisés dans la chambre à UV pendant 30 mn sont imbibés de l‘HE. A l‘aide d‘une pince stérile, le bout du disque est imprégné avec l‘HE jusqu'à sa totalité, puis, déposé soigneusement sur la gélose (la deuxième couche). Les boites de pétri sont laissées sur la paillasse pendant 30 mn puis elles sont incubées à 37°C/24h.

- **Lecture et interprétation des résultats**

Après l‘incubation, nous avons remarqué la formation de zones claires autour des disques (zones d‘inhibition) témoignant du pouvoir antimicrobien qu‘avait exercé l‘huile essentielle testée sur la souche microbienne.

Pour estimer le degré d‘efficacité de notre huile essentielle contre le germe ciblé, nous avons recouru à la méthode décrite par **ELA *et al.* (1996).** Celle-ci définit, selon le diamètre (Ø) des zones d‘inhibition, quatre degrés d‘efficacité :

-Fortement inhibitrice : Ø zones d‘inhibition>*28mm*.

-Modérément inhibitrice : *16mm*<Ø zones d‘inhibition<*28mm*.

-Légèrement inhibitrice : *10mm*<Ø zones d‘inhibition<*16mm*.

-Non inhibitrice : Ø zones d‘inhibition<*10mm*.

II.4.4.Analyse quantitative

Cette analyse a été réalisée selon le principe de la méthode de dilution en milieu solide nous renseigne sur les mesures suivantes :

CMI : la concentration minimale inhibitrice

CMB : la concentration minimale bactéricide pour les souches bactériennes

II.4.4.1.Détermination des CMI

Elle consiste à préparer des dilutions graduelles de l'HE dans de la gélose liquéfiée, puis à réaliser un ensemencement des différents germes en surface de la gélose après solidification.

La concentration de l'huile essentielle à partir de laquelle on n'observe plus de croissance microbienne est appelée CMI.

- **Protocole expérimental**

Préparer des suspensions microbiennes des germes sélectionnés. Dans des tubes à essai remplis de 5ml d'eau physiologique, réaliser des suspensions de 10^7-10^8 germes/ml à partir de jeunes cultures (18 à 24h). Puis à l'aide d'un spectrophotomètre, nous avons ajusté la transmittance à 22 % - 32 %.

A la suite de cela, préparer une gamme de dilution de l'HE d'*O. glandulosum* (2 % jusqu'à 0,03 %) dans le milieu de culture MH et avons rajouté du TWEEN 80 (tensio-actif) pour une meilleure homogénéisation de l'HE.

Pour la première dilution (2% d'HE**)**, verser dans un flacon 50 ml du milieu de culture MH liquéfié MH additionné de 0,5 % de TWEEN 80 et ajouter 1ml de l'HE. Après homogénéisation du mélange, verser dans un deuxième flacon la moitié du premier flacon et y avons rajouté 25ml du milieu pour obtenir la dilution1% de l'HE. Refaire l'opération jusqu'à l'obtention de la dernière dilution (0,03% d'HE).

Préparer des boites de pétri (2 boites pour chaque dilution) et inscrire dessus les valeurs respectives de chacune des dilutions. Puis, verser 20 ml de chaque dilution préparée dans la boite de pétri correspondante et laisser se solidifier sur paillasse.

Après la solidification des milieux dans les boites, tracer sur chacune des boites un quadrillage de deux larges colonnes traversées de lignes au nombre des germes à ensemencer (quatre lignes correspondant aux bactéries : *Staphylococcus aureus, E.coli, bacillussubtilis, Pseudomonas aeroginosa.*

Sur l‘une des colonnes, nous avons procédé à l‘ensemencement, à l‘aide d‘une micropipette (5µl) et dans leurs lignes respectives, chacune des suspensions microbiennes sous forme de spots de 2µl.

Sur les lignes de l‘autre colonne, nous avons soigneusement placé en face de chaque spot (de la première colonne) des disques en papier absorbant et nous les avons imbibé de chacune des dilutions microbiennes correspondantes. Une fois l‘opération achevée, incuber les boites de pétri à 37°C/24h.

Après incubation, vérifier les différentes boites en cherchant la plus faible concentration de l‘huile essentielle dont aucune croissance microbienne n‘est observée. Cette concentration est appelée concentration minimale inhibitrice ***CMI***.

I.4.4 .2.Détermination des CMB

- **Protocole expérimental**

Après avoir déterminé la ***CMI*** pour chacun des germes ciblés, déplacer avec une pince stérile, à partir des boites de pétri utilisées dans l‘expérimentation précédente, tous les disques en papier situés au-dessus de la ***CMI*** et les réintroduire dans de nouvelles boites de pétri coulées de milieu de culture **MH** sans HE. Le tout est porté à incubation 37°C/24h. Après incubation, retirer les boites et noter la plus petite concentration en HE où aucune croissance microbienne n‘est constatée.

Résultats et discussion

Les résultats des différentes expérimentations que nous avons réalisés sont répartis et exposés de la manière suivante :

- Résultats des analyses physicochimiques de l'huile essentielle d'O. *glandulosum*
- Résultats des tests antimicrobien de l'huile essentielle d'O.*glandulosum* «in vitro »

I. Résultats des analyses physicochimiques de l'HE d'O. *glandulosum*

I.1.Extraction de l'huile essentielle de l'*O. glandulosum*

L'huile essentielle d'*O. glandulosum* est obtenue par la méthode d'hydrodistillation.

I.2.Rendement d'extraction

Le rendement, qui est déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal sec et broyé, est exprimé en pourcentage. Les résultats des 03 essais effectués sont illustrés dans le tableau 6.

Tableau 6. Rendement d'extraction de l'huile essentielle

Matériel végétal	Essai	Rendement (%)	
Origanum glandulosum	1	2,37	2,38±0,01
	2	2,40	
	3	2,38	

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle d'*O.glandulosum* est estimé à 2.38%. Ce rendement est important comparé à celui rapporté par **BERREHAL *et al.* (2010)** indiquant que les parties aériennes d'*O.glandulosum* récolté en période de floraison dans la région de Jijel et de Constantine, ont une teneur en huiles essentielles de 2.0%.

Même constatation quant aux résultats de **SEMRA *et al.* (2013)** avec un rendement en huile essentielle de 2.2% de la même espèce récoltée dans la région de Zighoud Youcef (wilaya de Constantine) en période de floraison. Cependant les résultats de **SAHRAOUI *et al.* (2007)** ont révélé un rendement estimé à 2.5% pour la région de Sétif. Alors qu'un rendement plus élevé de l'ordre de 4.8%.a été rapporté par **BENDAHOU *et al*. (2008)** sur cette même espèce récoltée dans la région de Tlemcen.

Ces variations de teneurs en huiles essentielles d'*O.glandulosum* peuvent être attribuées à différents facteurs environnementaux prenant en compte que l'huile essentielle est un produit métabolique des cellules végétales et sa composition quantitative et qualitative peut être influencée par les conditions climatiques (notamment le type de climat, l'altitude, le taux d'exposition au soleil) le type de sol, le stade de croissance de la plante en question, le moment de la récolte et la méthode d'extraction **(BESOMBES, 2008 ; BEJAOUI *et al.*, 2013).**

I.3. Caractéristiques organoleptiques de l'HE de *l'Origanum glandulosum*

Pour apprécier la qualité organoleptique et physicochimique de notre huile essentielle, nous avons effectué des tests suivant les normes AFNOR assignées pour les huiles essentielles. Le tableau 7 ci-dessous regroupe les différentes comparaisons des propriétés organoleptiques, entre nos résultats et les normes décrites par l'AFNOR **(AFNOR, 2000)**.

Tableau 7: Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de ***l'Origanum glandulosum***

Caractères organoleptiques HE	**Couleur**	**Aspect**	**Odeur**
H.E d'O.glandulosum (Notre échantillon)	Jaune clair	Liquide visqueux	Fortement aromatique et amère
H.E d'O. glandulosum ***(AFNOR ,1999)***	Jaune pale	Liquide limpide	Camphrée

I.4. Indices physicochimiques de l'HE de *l'O.glandulosum*

I.4.1. Densité relative 20°C

L'un des paramètres essentiels concernant la qualité des huiles essentielles est bien évidemment les caractères physico-chimiques. Ceux-ci nous permettent de confirmer la

qualité de l'HE d'*O.glandulosum* par l'analyse de leur densité relative et indice de réfraction à 20 °C. Les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau 08.

La densité relative est la fraction de 1g d'HE sur 1g d'eau. Elle nous renseigne si l'HE est plus lourde ou plus légère que l'eau. La bibliographie nous renvoie que la plupart des huiles essentielles ont une densité inferieure à celle de l'eau sauf pour quelque unes d'entre elles, telles que celle du clou de girofle et de cannelle **(RHAYOUR, 2002).**

I.4.2. Indice de réfraction 20°C

L'indice de réfraction est une mesure qui nous renseigne sur la dimension des chaines hydrocarbonée présentes dans une huile donnée **(O'BRIEN, 2009).** Si une huile essentielle a un indice de réfraction élevé, ceci veut dire que les chaines moléculaires hydrocarbonées qui la forment sont d'autant plus courtes et donc plus nombreuses qu'elles réfractent la lumière qui passe à travers.

Pour notre huile essentielle, son indice de réfraction (1,499) reste conforme à la norme *AFNOR* (1,4900-1,5040).

Tableau8 : Indices physicochimiques de l'HE de *l'O.glandulosum*

IndPhys-ch/HE	Densité relative	Indice de réfraction à 20°C
HE *O. glandulosum* (notre échantillon)	0,9617	1,499

En résumé, nous constatons que les caractéristiques organoleptiques et les paramètres physico-chimiques de notre huile essentielle se retrouvent dans les fourchettes des normes établies par l'**AFNOR (2000).**

II. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*O.glandulosum*

L'utilisation d'un solvant approprié est primordiale. Effectivement, la toxicité du solvant vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques peut être critique. Même à l'état de trace le solvant ne devrait pas entraver la procédure du test biologique. Une attention particulière devrait également être accordée aux interactions possibles entre le solvant et les solutés, car le solvant peut réagir avec certains composés de l'huile essentielle ou de l'extrait

et causer la décomposition, la déshydratation ou l'isomérisation de ces composés **(YRJÖNEN, 2004)**.

Notre choix s'est porté sur le TWEEN 80 (tensio-actif), fréquemment utilisé dans les études en microbiologie. Ce solvant a subi des tests préliminaires dans le but de connaitre son effet vis-à-vis de notre huile essentielle et des souches microbiennes. Il s'est sont avéré sans danger pour les microorganismes et n'interfèrera donc pas dans la lecture des résultats.

L'activité antibactérienne de l'HE d '*O.glandulosum* contre les bactéries testées est réalisée par la méthode des disques. Leur potentiel antibactérien est qualitativement et quantitativement évalué par la mesure du diamètre des zones d'inhibition et la détermination des valeurs des CMI et CMB.

II.1. Évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne

Le pouvoir antimicrobien est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm) selon l'échelle cité par **MUTAI *et al*. (2009).**

Afin de pouvoir comparer nos résultats, nous avons opté de tester deux antibiotiques de synthèse (Pénicilline, Amoxicilline), largement utilisés en pharmacologie contre les espèces microbiennes de référence. La référence d'interprétation adoptée au cours de cette étude qualitative est l'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne donnée par **ELA et al, (1996).**

Les diamètres moyens des zones d'inhibition observées autour des disques imprégnés d'HE des souches de référence et des deux antibiotiques testées sont résumés dans le tableau 9.

Tableau 9: Diamètres des zones d'inhibition de l'HE d'*O.glandulosum* vis-à-vis des antibiotiques testés

	Souches Microbiennes	**aromatogramme Ø des zones d'inhibition (mm)**	**antibiogramme Ø des zones d'inhibition (mm)**	
		H.E *O.glandulosum*	**Pénicilline**	**Amoxilline**
Bactéries Gram+	***B.subtilis 9372***	19	Absence	Absence
	S.aureus 6538	43	50	40
Bactéries Gram-	***P.aeroginosa 4352***	12	Absence	Absence
	E.coli 4157	14	11	14

L'analyse globale des résultats consignés dans le tableau 09 révèle que l'H.E étudiée présente un potentiel antimicrobien qui varie entre une action légèrement inhibitrice et modérément inhibitrice en fonction de sa concentration et de la nature des souches testées.

Par ailleurs les souches bactériennes *Bacillus subtillus et Pseudomonas aeruginosa* manifestent une sensibilité modérée (19 mm) et légèrement (12 mm) inhibitrice vis-à-vis de notre HE, à l'inverse de l'amoxicilline et la pénicilline dont l'inhibition est quasiment nulle vis-à-vis ces deux espèces bactériennes.

Selon **LAMBERT *et al,*. (2001),** la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux huiles essentielles étudiées n'est pas surprenante. En effet il a été prouvé que cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides qui en relation avec la nature de sa paroi qui est doté comme toute bactérie gram- , d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et une assise externe constitué de lipopolysacharides et de protéines.

Toutefois, **CHAO *et al.*, (2000), DE FEO *et al.*, (2003)** ont rapporté que la faible sensibilité *Pseudomonas aeruginosa à* l'action des huiles essentielles peut être due à sa membrane externe particulière et à sa capacité de métaboliser un large éventail de composés organiques. Ceci peut expliquer son niveau élevé de résistance. *Stapylococcus aureus* s'est avérée la plus sensible à l'action de l'H.E parmi les germes testés, cette sensibilité accrue est confirmée par les résultats de plusieurs auteurs **(FRIEDMAN et *al.*, 2002).**

Selon **DORMAN (2000),** la sensibilité est indépendante du gram, ou dépend des HE utilisées. Cependant, le même auteur précise que l'activité anti microbienne d'une HE est à mettre en relation avec sa composition chimique.

En résumé, on peut dire que toutes les souches bactériennes testées ont montrées un certain degré de sensibilité à l'HE testée. Ainsi, on peut classer les microorganismes en fonction de leur degré de sensibilité par le classement décroissant suivant :

S.aureus > B.subtilis > E.coli > P.aeroginosa

L'effet de l'HE extraite sur les souches *E. coli* d'origine aviaire était important, les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Sensibilité des souches *d'E. coli* aviaires vis-à-vis de l'HE *d'O. glandulosum* et des antibiotiques testés

Souches bactériennes	Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
	HE *O.glandulosum*	**Pénicilline**	**Amoxicilline**
1	20	0	0
2	24	0	0
3	29	0	0
4	25	0	0
5	22	0	0
6	31	0	0
7	25	0	0
8	23	0	0
9	26	0	0
10	22	0	0
Moyenne	24,7	0	0

A travers l'évaluation *in vitro* du pouvoir antibactérien de l'HE d'O. glandulosum vis-à-vis des souches d'*E.coli* aviaires, il paraît évident que les souches bactériennes testées ont présenté une sensibilité modérée.

Les dix souches *E. coli* testées par l'HE sont résistantes à la Penicilline et l'amoxicilline.

Nos résultats sont en accords avec plusieurs travaux. Selon une étude menée par **YAMAZAKI et *al.*, *(*2004)**, le carvacrol avait le plus puissant effet contre *Listeria monocytogenes*, suivi par le thymol, l'eugénol, le cinnamaldéhyde et l'isoeugénol.

Le carvacrol et le thymol ont un effet inhibiteur, ils constituent les composés phénoliques majoritaires de l'huile essentielle d'origan **(SKOULA *et al.*, 1999).** L'activité antibactérienne de cette huile essentielle est en grande partie attribuée à ces deux composants **(ALIGIANNIS *et al.*, 2001).**

I.2. Évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne

Pour définir la nature exacte de cette activité, c'est-à-dire, savoir si notre huile essentielle est bactéricide ou bactériostatique contre les germes testés, nous avons calculé les rapports CMB/CMI.

Les CMI et CMB mesurées sont rapportées dans les tableaux 11 et 12.

Selon **OUSSOU *et al.*,(2008),** si le rapport:

CMB/CMI ≤ 4 l'HE est bactéricide **CMB/CMI ≥ 4** l'HE est bactériostatique

Tableau 11 : CMI et CMB de l'HE d'*O.glandulosum* vis-à-vis des souches de référence

Gram	Souche	%CMI	%CMB	CMB/CMI	Interprétation
Gram +	***B.subtilis 9372***	0,125	0,125	1	Bactéricide
Gram+	***S.aureus 6538***	0,06	0,125	2	Bactéricide
Gram-	***P. aeruginosa 4352***	0,25	0,25	1	Bactéricide
Gram-	***E.coli 4157***	0,125	0,125	1	Bactéricide

Le tableau 11 révèle que l'HE testée possède une action inhibitrice de la croissance à divers degrés vis à vis de tous les germes testés.

Tableau 12 : CMI et CMB de l'HE d'*O.glandulosum* vis-à-vis des souches aviaires

Souche	% CMI	%CMB	CMB/CMI	Interprétation
1	0,25	0,25	1	Bactéricide
2	**0,125**	0,125	1	Bactéricide
3	**0,125**	0,125	1	Bactéricide
4	0,06	0,06	1	Bactéricide
5	0,25	0,25	1	Bactéricide
6	0,25	0,25	1	Bactéricide
7	0,25	0,125	0,5	Bactéricide
8	**0,125**	0,25	2	Bactéricide
9	**0,125**	0,125	1	Bactéricide
10	**0,125**	0,125	1	Bactéricide

Le tableau 12 rapporte les valeurs des CMI et CMB de l'HE d'*O.glandulosum* vis-à-vis des souches aviaires. Celles-ci ont pris des valeurs variables allant de 0,06 % jusqu'à 0,25 % avec prés de la moitié des bactéries inhibées ayant une CMI de 0,125%.

A partir de tous ces résultats, on constate que l'HE d'origan est très efficace contre les souches testées. L'efficacité de cette substance naturelle contre les souches d'*E. coli* a été également citée par de nombreux travaux, notamment ceux réalisés sur cinq HE et qui ont montré des propriétés bactéricides intéressantes de l'HE d'origan et de Thym sur *E. coli* **(BURT, 2004).**

Dans cette dernière étude, l'HE d'origan et de girofle ont provoqué une lyse cellulaire des bactéries associée à une mortalité rapide sur *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* **(RHAYOUR *et al.*, 2001).**

CONCLUSION

L'émergence d'une résistance bactérienne aux agents antimicrobiens habituels est aujourd'hui un défi majeur en thérapeutique humaine et animale. En conséquence, la recherche de nouveaux agents antimicrobiens st devenu une nécessité.

Dans ce contexte, un grand intérêt a été porté sur les substances naturelles ayant une activité antibactérienne. Les huiles essentielles se présentent comme les meilleurs candidats pour participer à la recherche des alternatives.

Les résultats obtenus dans cette étude confirment la grande activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur des souches d'*E. coli* d'origine aviaire résistantes à la pénicilline et à l'ampicilline. Le potentiel antimicrobien de l'huile essentielle extraite vis-à-vis des souches *E.coli* aviaires s'est révélé intéressant avec des diamètres des zones d'inhibition de l'ordre de 24mm et des concentrations minimales inhibitrices de l'ordre de 0,125%. De même, les résultats des indices physico-chimiques de l'HE étaient conformes aux normes AFNOR.

Cette bioactivité de l'huile essentielle extraite est en relation avec sa composition chimique, riche en substances phénoliques.

Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'efficacité de l'huile essentielle étudiée :

- Fractionnement et isolement des différents constituants de l'huile essentielle afin de connaitre la ou les molécules à l'origine des effets antibactériens et l'éventuelle synergie entre elles.
- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne et antioxydante *in vivo* sur un modèle biologique.
- Etude de l'efficacité de ces extraits dans le domaine alimentaire afin d'établir leur utilité comme agents antimicrobiens ou antioxydants naturels dans la sécurité alimentaire.
- Etude des moyens d'incorporation de l'huile essentielle et de son utilisation dans les élevages aviaires.

Références bibliographiques

AFNOR (2000). Recueil de normes **:** Huiles essentielles. Échantillonnage et méthodes d'analyses. Tome1. (A à G). NF T 75-104. ISO279 : 1998(F). ISO 280 : 1998(F).ISO 592 :1998(F).ISO 1242 : 1999(F).

AFNOR (2000). Recueil de normes : Les huiles essentielles. Monographie relatives aux huiles essentielles. Tomme 2. (H à Y). AFNOR, Paris. pp : 661-663.

AFNOR, 2000 : Huiles essentielles. Échantillonnage et méthodes d'analyse (tome 1) – Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. Volumes 1 et 2. mars.

AHMED S.M., ABDELGALEIL S.A.M.,2005 : Antifungal activity of extracts and sesquiterpene lactones from Magnolia grand flora L. (*magnoliaceae*).Int. J. Agri. Biol. Vol.7, № 4, page 638-642.

ALIGIANNIS N., KALPOTZAKIS E., MITAKU S., AND CHINOU I.B.(2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species.*J.* Agric. And Food Che., 40: 4168-4170

ARMANDO C.C., RAHMA HY., 2009: Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils From: *eucalyptus globulus*, *cymbopogoncitratus* and *rosmarinus officinalis* (uganda). Revue colombianacienc. Anim. 1 (2), pp. 240-250.

ARRAS G., USAI M., 2001: Fungi toxic activity of essential oils against four post harvest citrus pathogens chemical analysis of *thymus capitatu*s soil and its effect in subatmospheric pressure conditions. J. Food. Prot. Volume 64. pp: 1025-1029.

ARVY M.P., GALLOUIN F., 2003: Epices, aromates et condiments. Ed. Belin, Paris.412 p.

BABA AISSA F., 1991 : Les plantes médicinales d'Algérie: identification, description, principes actifs, propriétés et usage traditionnel des plantes communes en Algérie. Ed. Bouchène et Ad. Diwan, Alger. page 121.

BABA AISSA F., 1999 : Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb. Librairie moderne-Rouiba, page 194–231.

BAJPAI V K., KANG S.C., 2010: Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *metasequoia glyptostroboidesmiki* ex hu. J. Am. Oil. Chem. Soc. Volume 87. pp. 327-336.

BASER K.H.C., BUCHBAUER G., 2010: Handbook of essential oils: Science,Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994page.

BÉJAOUI A., BOULILA A., BOUSSAID M.,2013:Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *origanum vulgare* subsp. *Glandulosum Desf.* from Tunisia. J. Med. Plants Res. 7.page 2429-2435.

BELHATTAB R., LAROUS L., FIGUEIREDO CA., 2005: *Origanum glandulosum* Desf Grown Wild in Algeria: Essential oil composition and glycosidic bound volatiles. Flavour Fragr J 20. Page 209–212.

BENDAHOU M., MUSELLI A., DUBOIS M.G., BENYOUCEF M., DESJOBERT J.M., BERNANDINI 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 Chemistry106.page 132-139.

BERREHAL D., BOUDIAR T., HICHEM L., KHALFALLAH A., KABOUCHE A., AL-FREIHAT A., GHANNADI A., SAJJADI E., MEHRABANI M., SAFAEI-GHOMI J., KABOUCHE Z., 2010: Comparative composition of four essential oils of Oregano used in Algerian and Jordanian folk medicine. Nat. Prod. Commun. 5: page 957 – 960.

BESOMBES C., 2008 : Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques, Applications généralisées. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, France.

BOUHADDOUDA N.,2016 : Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *origanum vulgare et mentha pulegium*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar –Annaba.

BOUHDID S., ABRINI J., BAUDOUX D., MANRESA A., ZHIRI A.,(2012). Les huiles essentielles de l'origan compact et de la cannelle de Ceylan: pouvoir antibactérien et mécanisme d'action. *Journal de Pharmacie Clinique*, Volume 31, Numéro 3.

BURT S., 2004: Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods. International Journal of Food Microbiology. Vol 94 (3).page 223-253.

CAPECKA E., MARECZEK A., LEJA M., 2005: Antioxydant activity of fresh and dry herbs of *omelamiaceae* species. Food chemistry 9.page 223-226.

CAPLIN J.L., ALLAN I., HANLON G.W., 2009: Enhancing the in vitro activity of Thymus essential oils against *staphylococcus aureus* by blending oils from specific cultivars. International Journal of Essential Oil Therapeutics.Vol 3. page 3539.

CARILLON Alain, 2009 : Place de la Phytothérapie dans les systèmes de santé au XXIème siècle. Séminaire International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales. Djerba, Mars 2009.

CARSON C.F., RILEY T.V., 1995 : Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *melaleuca alternifolia.J*. ApplBacteriol. Vol 78(3).page 264-269

CHANG C.W., CHANG W.L., CHANG S.T., CHENG S.S., 2008: Antibacterial activities of plant essential oils against *legionella pneumophila*. water research. vol 42. page 78-286.

CHAO *et al*., 2000.Screening for inhitory activity of essential oils on selected bacteria funguin and viruses, j. essent.Oil.Ress., n.12,p.p. 63-649

CHASLUS-DANCLA E., 2001: Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet Res. 2001 May-Aug;32(3-4). Page 201.

CHIEJ R., 1984: Macdonald encyclopedia of medicinal plants. Ed MACDONALD, London, pp. 212–217.

COX S.D., MANN C.M., MARKHAM J.L., BELL H.C., GUSTAFSON J.E., WARMINGTON J.R., WYLLIE S.G., 2000: The mode of antimicrobial action of the essential oil of *melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology.Vol 88.pp: 170-175.

DAVIDSON P.M et PARISH M.E, 1989, Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. *Food Technology*, ***43***(1), 148-155p**.**

DE FEO V. *et al.*, 2003. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from thymus spinulosis ten. (lamiaceae). J .agric. food chem.,n. 51, p.p. 3849-3853
DIDRY N., DUBREUIL L., PINKAS M., 1993: Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination.Pharmazie.Vol 48(4). Page 301-304.

DORMAN, H.J.D. 1999-2000: Phytochemistry and bioactive properties of plant volatile oils: antibacterial, antifungal and antioxidant activities. PhD Thesis, University of Strathclyde, Glasgow.

DOSSO S., 2014 : Analyse des pratiques avicoles et de l'usage des antibiotiques en aviculture moderne dans le departement d'Agnibilekrou (cote d'Ivoire). Thèse.Med.Vet. Dakar ;13

ELA M.A., EL-SHAER N S. et GHANEM N B. (1996). Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and tixedolls. Pharmazie; 51 pp.993- 995.

ELHANI D., (2011).L'émergence de la résistance aux antibiotiques annonce-t-elle le retour des âges sombres? Ann Biol Clin *2011* ; 69(6) : 637-46.

EYMARD S., 2003 : Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*trachurus trachurus*), choix des procédés. Thèse de Doctorat en Génie de procédés. Ecole Doctorale en Génie des Procédés, Spécialité Biochimie. Nante, France.

FIGUEREDO G., 2007 : Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origan *(lamiaceae)* cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de Doctorat. Université Clermont-Ferrand, France.

FU Y., ZU Y., CHEN L., EFFERTH T., LIANG H., LIU Z., LIU W., 2007: Investigation of antibacterial activity of rosemary essential oil against *propioni bacterium* acnes with atomic force microscopy. Planta medica. Page 1-20.

FRIEDMAN M., HENIKA P.R., MANDRELL R.E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolate d constituents against *Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes,* and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot*., 65: 1545-156.

GUERIN-FAUBLEE V., CARETTE G., 1999 : L'antibiogramme : principes méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales GTV –INRA. Page 5-12.

GUIGNARD J. L., 2001 : Botanique systématique moléculaire. Ed MASSON ,12. page174-179.

HADI M., 2004 : La quercétine et ses dérivés: molécules à caractères pro-oxydants ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Mémoire doctorat. Option Pharmacochimie. Université Louis Pasteur. Strasbourg.155 p

HILAN C., BOUAOUN D., et al, 2009. Propriétés antimicrobiennes et toxicité par détermination de la DL50 de l'huile essentielle de Prangos asperula Boissier in Springer Phytothérapie, n.7 , p.p.8-14.

IETSWAART J.H., 1980 : A taxonomic revision of the genus *origanum* (*labiateae*). PhD Thesis. Leiden Botanical Series, vol. 4. Leiden University Press, The Hague, Netherlands.

JUVEN B.J., KANNER J., SCHVED F., WEISSLOWICZ H., 1994: Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J. Appl. Bacteriol. Vol 76.page 626-631.

KNOBLOCH K., PAULI A., IBERL N., WEIGAND N., 1989: Antibacterial and antifungal properties of essential oil components .J Essent Oil Res. Vol 1. Page 119–128.

LAHLOU M., 2004: Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Research. Vol 18.page 435-448.

LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N., COOTE P.J. ET NYCHAS.G.-J.E., (2001).A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol

LEE K.H., HUANG E.S., PAGANA J.S., GEISSMAN T.A., 1971 : Cytotoxicity of sesquiterpenes lactones. Cancer Reasearch Vol 31.pp: 1649-1654.

LIS-BALCHIN M., HART S., SIMPSON E., 2001 : Buchu (*agathosmabetulina*and*a.crenulata*, Rutaceae) essential oils: their pharmacological action on guinea-pig ileum and antimicrobial activity on microorganisms. J. PharmPharmacol. Vol 53(4). page 579-582.

MALECKY M., 2007 : Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de DOCTORAT. INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris. Page 30-35.

MATEO Clélia., 2016 : thèse contribution a l'étude de l'usage des antibiotiques en filières aviaires et aux conséquences de cet usage en matière d'antibioresistance. vet agro sup campus vétérinaire de lyon - Thèse n°119.

MATHIEU Marie-José., FONTENEAU Jean-Marie., 2008 : Le manuel porphyre du préparateur en pharmacie. Editions Porphyre, France. 1410p

MOGENET L., FEDIDA D., 1998: Rational antibiotherapy in poultry farming Libourne : CEVA- 149p.

MUTAI C., BII C., VAGIAS C., ABATIS D. et ROUSSIS V. (2009). Antimicrobial activityof *Acacia mellifera* extracts and lupanetriterpenes. Journal of Ethopharmacology. doi:10.1016/j-jep.02.007.

O'BRIEN D., (2009). Fat and oils: formulating and processing for application. 3ème Edition.CRC Press, USA. pp: 43- 47.

OUSSOU K.R., YOLOU S., BOTI J.B., GUESSENND K.N., KANKO C., AHIBO C. et CASANOVA J. (2008). Etude Chimique et Activité Antidiarrheique des Huile Essentielles de deux Plantes Aromatiques de la Pharmacopie Ivoirienne. Europpean Journal of Scientific Research.N°1, Vol 24. pp: 94- 103.

PEREZ C., AGNESE A.M., CABRERA J.L., 1999: The essential oil of *senecio graveolens* (compsitae): chemical composition and antimicrobial activity tests. J. Ethnopharmacol. Vol 66 (1). page 91-96.

PERRY.J, STALEY.Jet LORY.S, (2002). Microbiologie. Édition par Sinauer Associates .États-Unis. P 160,163, 164,165

QUEZEL P., SANTA S., 1962-1963 : Nouvelle flore de l'Algérie et régions désertiques méridionales. Tome 2. Centre national de la recherche, Paris. Page 565.

RHAYOUR K., 2002 : Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *esherichia coli, bacillus subtiliset*sur *mycobacterium phlei* et *mycobacterium fortuitum.* thèse de doctorat. université sidi mohamed ben abdellah. fès. page158.

RHAYOUR K., T. BOUCHIKHI, A. TANTAOUI-ELARAKI, K. SENDIDE AND A. REMMAL (2001). The mechanism of bactericidal action of Oregano and Clove essential oils and their phenolic major components in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, Journal of essential oil research, 15:356-362.

RUBERTO G, BARRATTA M.T., SARI M., KAABECHE M., 2002: Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *origanum glandulosum* desf. flavour and fragrance j. 17. Page 251–254.

SAGDICET Ozcan., 2003: Antibacterial activity of turkish spice hydrosols. food control. 14-141-143.

SAHRAOUI N., BENTAHAR F., BOUTEKEDJIRET C., 2007: Analytic study of the essential oil of *origanum glandulosum* (Desf.) from Algeria. J. Essent. Oil Bear. Pl. 10(2). page 145 – 150.

SCHULZ V., HANSEL R., 2008: Rational Phytotherapy: A Reference Guide for Physicians and Pharmacists. Natural news library.

SCIMECA DANIEL, TETAU MAX, 2005: Votre santé par les plantes. Le guide familial pour prévenir et guérir tous les maux quotidiens. Les plantes les plus efficaces, leur mode d'utilisation, les meilleures associations. Editions Alpen. page136.

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) .page 381-385.

SIDDIQUI Y.M., ETTAYEBI M., HADDAD A.M., AL-AHDAL M.N., 1996: Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type 1 and Nawcastle disease virus. Med. Sci.Res. Vol 24. page 185-186.

SIJELMASSI A., 1991: Les plantes médicinales du Maroc. 2e éd., Le Fennec. page 199.

SIKKEMA J., DE BONT J.A.M., POOLMAN B., 1995: Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews. Vol 59(2). page 201-220.

S**KERGET M., KATNIK P., HADOLIN M., HROS A.R., SIMONI C., KNEZ Z., 2005:** Phenols, proanthoyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidants activities. Food chemistry. 89. page191-198.

SKOULA M., GOTSIOU P., NAXAKIS G., JOHNSON C. B. (1999),A chemosystematic investigation on the mono and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae), *Phytochemistry*, 52: 649-657.

SOUZA E.L., GUERR N.B., STAMFORD T.L.M., LIMA E.O., 2006: Spices:alternative sources of study of citrus essential oils. Flavour and Fragrance Journal.Vol 20.page 249-264.

SU Y.C., HO C.L., WANG I.C., CHANG S.T., 2006: Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts. Taiwan J. For Sci. Vol 21 (1). page 49-61.

TANI, Z. B. A.-K ET ARLET, G. (2014). Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie, 62*(3), 169-178.

TANTAOUI-ELARAKI A., FERHOUT H., ERRIFI A., 1993: Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *thymus broussonettii, T.zygis* and *T.satureioides*. J. Essent. Oil. Res. Vol 5. page 45-53.

TEUSCHER E., ANTON R., LOBSTEIN A., 2004 : Plantes aromatiques: Epices, aromates condiments et huiles essentielles. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

TRAORE M.C., 2006 : Étude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse de doctorat.Université de Bamako, Mali. page 175.

ULTEE A., KETS E.P.W., SMID E.J., 1999: Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *bacillus cereus* .J. Appl. Microbiol. Vol 65(10).page 4606-4610.

ULTÉE A., SLUMP R.A., STEGING G., SMID E.J., 2000: Antimicrobial activity of carvacrol towards *bacillus cereuson* rice. J. Food Prot. Vol 63(5). Page 620-624.

VALNET J., DURAFFOURD C.H., DURAFFOURD P., CILAPRAZ J., 1978 : L'aromatogramme : nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques.

VILLATE D., 2001: maladies des volailles: manuel pratique, Paris : Éd. France agricole, 399p.

VRINDA MENON K., GARG S.R., 2001: Inhibitory effect of clove oil on *listeria monocytogenes* in meat and cheese. Food Microbiol.vol 18. page 647-650.

WENDAKOON C. N., SAKAGUCHI M., 1995: Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *enterobacter aerogenes* by active components in spices. journal of food protection.vol 58. page 280-283.

WILKINSON J.M., 2006: Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII.

YAMAZAKI K, YAMAMOTO T, KAWAI Y, INOUE N.,(2004): Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester.Food Microbiol. 21: 283-289.

YRJÖNEN T., 2004. Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Academic dissertation, University of Helsinki, Finlande.p: 19.

ZAIKA L.L., 1988: Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its Determination. Journal of Food Safety. Vol 9- 2. Page 97-118.

ZANELLA A., ALBORALI GL., BARDOTTI M., CANDOTTI P., GUADAGNINI P.F., MARTINO A., STONFER M.,2000: severe *escherichia coli* septicemia and polyserositis in hens at start of lay. Avianpathology, 29. Page 311-317.

Annexe

Composition des principaux milieux de cultures utilisés

- **Milieu de MUELLER-HINTON gélose (M-H) : (g/l)**

Infusion de viande de bœuf…….02g
Hydrolysat acide de caséine……17,5g
Amidon…….....01,5g
Agar……..10g
pH : 7.4
Autoclaver pendant 15 min à115°C

- **Tryptone-soja-agar (TSA): (g/l)**

Tryptone……15g
Peptone de soja…….....5,0g
Chlorure de sodium……5g
Agar……15g
Autoclaver pendant 15 min à 121°C.

- **Eau physiologique 9% (NaCl)**

Sodium Chloride (Fluka)……9g
H_2O déminéralisée…….....1000 ml

- **Bouillon BRAIN HEART INFUSION (BHIB) CM 225: (g/l)**
-

Protéase-peptone ……..10g
Infusion de cervelle de veau…….12,5g
Infusion de Cœur de bœuf…….5g
Chlorure de sodium……5g
Phosphate disodique Chloramphénicol……..2,5g
Glucose……..….2g
Eau distillée qsp…….1000ml
PH = 7,4
Autoclaver pendant 15 min à 121°C.

- **Gélose Chapman: (g/l)**

Extrait de viande …….1g
Extrait de levure……..3g
Tryptone……..5g
Peptone bactériologique……10g
Chlorure de sodium……...70g
Manintol……..10g
Rouge de phénol……0,025g
Agar…….15g
PH = 7,4 **;**Autoclaver pendant 15 min à 121°C

Résumé

La résistance bactérienne aux antibiotiques et la recherche de nouvelles alternatives à ces derniers revêtent une grande importance en santé humaine et animale. L'objectif principal de cette étude a été d'évaluer les propriétés antibactériennes de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire résistantes aux antibiotiques d'utilisation courante en aviculture. Ces propriétés ont été évaluées e n utilisant la technique usuelle de diffusion sur gélose pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une activité antibactérienne modérée avec vis-à-vis de l'huile essentielle et des antibiotiques testés, en donnant les plus grands diamètres d'inhibition qui ont respectivement varié de 20 à 31mm. Les concentrations minimales inhibitrices ont pris des valeurs variables allant de 0,06 % jusqu'à 0,25 %
L'effet antibactérien a été aussi testé contre d'autres bactéries de référence (*B.subtilis, S.aureus, P.aeruginosa)* avec des résultats intéressants.
Ces résultats permettent de conclure que l'utilisation de l'huile essentielle d'origan pourrait être une alternative efficace pour pallier aux résistances bactériennes sans cesse en évolution.

Mots-clés: Huile essentielle d'*Origanum glandulosum*, *Escherichia coli*, antibiorésistance, activité antibactérienne, CMI, poulet de chair.

Summary

Bacterial resistance to antibiotics and the search for new alternatives to antibiotics are of great importance in human and animal health. The main objective of this study was to evaluate the antibacterial properties of *Origanum glandulosum* essential oil on avian resistant *Escherichia coli* strains resistant to antibiotics commonly used in poultry farming. These properties were evaluated using the usual agar diffusion technique for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). The results obtained made it possible to demonstrate a moderate antibacterial activity with respect to the essential oil and antibiotics tested, giving the largest inhibition diameters which respectively varied from 20 to 31 mm. Minimum inhibitory concentrations ranged from 0.06% to 0.25%
The antibacterial effect was also tested against other reference bacteria (*B.subtilis, S.aureus, P.aeruginosa*) with interesting results.
These results lead to the conclusion that the use of Oregano essential oil could be an effective alternative to overcome the constantly evolving bacterial resistance.

Key words: *Origanum glandulosum* essential oil, *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, antibacterial activity, MIC, broiler.

الملخص

المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية والبحث عن بدائل جديدة للمضادات الحيوية لها أهمية كبيرة في صحة الإنسان والحيوان. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم الخواص المضادة للبكتيريا للزيوت الاساسية المستخلصة من نبات الزعتر على السلالات الإشريكية القولونية الخاصة بالطيور و المقاومة للمضادات الحيوية شائعة الاستعمال في مجال تربية الدواجن تم تقييم هذه الخصائص باستخدام تقنية نشر أجار المعتادة لتحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط . مكّنت النتائج التي تم الحصول عليها من إثبات وجود نشاط معتدل مضاد للبكتيريا فيما يتعلق بالزيوت الأساسية والمضادات الحيوية التي تم اختبارها ، مما أعطى اكبر أقطار تثبيط تراوحت من 20 إلى 31 مم. تراوحت تركيزات الحد الأدنى المثبطة من 0.06 ٪ إلى 0.25 ٪

تم اختبار تأثير مضاد الجراثيم أيضا ضد البكتيريا المرجعية (ب. سوبتيليس ,س.اوريوس, ب. ايروجينوزا) مما اعطى نتائج مثيرة للاهتمام.هذه النتائج تؤدي إلى استنتاج مفاده أن استخدام زيت أوريجانو الأساسي يمكن أن يكون بديلاً فعالاً للتغلب على المقاومة البكتيرية المتطورة باستمرار.

الكلمات الرئيسية: الزيوت الاساسية لزعتر، الإشريكية القولونية ، مقاومة مضادات الميكروبات ، الحد الأدنى للتركيز المثبط, النشاط المضاد للبكتيريا ، الدجاج اللاحم