

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique*  
*Université de Bejaïa*

*Faculté des sciences de la nature et de la vie*  
*Département : Biologie Physico-chimique*  
*Spécialité : Pharmaco-Toxicologie*



**Réf :....**

*Mémoire de fin de Cycle*  
*En vue de l'obtention du*  
*diplôme*

**MASTER**

***Thème***

**Evaluation de l'activité antifongique d'une pommade à  
base des huiles essentielles d'*Origanum vulgare***

Présenté par :

**Acharchour Dyhia & Kafiz Henifa**

Soutenu le : **12 Septembre 2022**

**Devant le jury composé de :**

Mme KENDI-KARA S.	MAA	Présidente
Mme BAKDI- BOULELLOUTA H.	MAA	Examinatrice
Mr BELKACEM N.	MCB	Promoteur
Mme BELKADI A.	Docteur	Co- promotrice

*Année Universitaire : 2021/2022*

## *Dédicace*

*Je tiens à dédier ce modeste travail*

*A celle qui m'a arrosé de la tendresse et d'espoirs, à la source d'amour  
incessible, A la mère des sentiments sublimes qui ma bénie*

*Par ses prières.... **Ma mère***

*A mon support dans ma vie, qui m'a appris, m'a encouragé et m'a dirigé  
...**mon père***

*A mon frère **Nadjib** et ma sœur **kenza** qui ont toujours été là et qu'illumine  
Mon chemin*

*A ma grand-mère **Nedjima** que Dieu l'as garde et l'as protégé*

*A tous mes oncles et leurs épouses*

*A tous mes cousins et cousines, spécialement **Thinhinane, Dalia et Ania***

*A tous ceux qui me sont chers, spécialement **Koceila***

*A toute personne ayant contribué de loin ou de près à ce travail*

***Henifa***

## *Dédicace*

*Je tiens à dédier ce modeste travail*

*A celle qui m'a arrosé de la tendresse et d'espairs, à la source d'amour  
incessible, A la mère des sentiments sublimes qui ma bénie*

*Par ses prières.... **Ma mère***

*A mon support dans ma vie, qui m'a appris, m'a encouragé et m'a dirigé ...**mon  
père***

*A mon frère **Bouzid** et ma sœur **Lydia** qui ont toujours été là et qui illuminent  
mon chemin*

*A la mémoire de ma grand-mère **Ardjoune Keltouma***

*A tous mes oncles et leurs épouses, mes cousins et mes cousines*

*A tous mes amis, spécialement **Abdelfattah Meriem** et **Loualia Anis***

*A toute personne ayant contribué de loin ou de près à ce travail.*

***Dyhia***

## **Remerciement**

*On tient tout d'abord à remercier très chaleureusement notre encadrant monsieur **Belkacem Nassim**, pour l'encadrement et toute l'aide et le temps qu'il nous a consacré tout au long de notre mémoire en particulier et durant nos années à l'université en général.*

*On adresse aussi nos remerciements à Mme **Belkadi Asma** de nous avoir donné l'opportunité d'effectuer un stage au sein du laboratoire pharmaceutique du groupe Sidal (CRD), de nous avoir accompagné et guidé durant toute la durée de notre stage et la patience dont elle a fait preuve afin de nous orienter au mieux.*

*Nous tenons à remercier Mme **Kara** d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.*

*Notre remerciement s'adresse également à Mme **Bakdi**, d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Enfin, on remercie quiconque, qui de près ou de loin, a contribué à la réalisation de ce travail.*

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Généralités, Huiles essentielles, Espèces «<i>Origanum Vulgare L</i> »</b> .....	<b>3</b>
<b>I. Généralités</b> .....	<b>3</b>
<b>I.1. La Famille des lamiacées</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2. <i>Origanum vulgare</i></b> .....	<b>3</b>
I.2.1. Classification botanique de l' <i>Origanum vulgare</i> .....	4
I.2.2. Historique .....	5
<b>I.3. Définition des huiles essentielles</b> .....	<b>5</b>
I.3.1. Propriétés physico-chimiques des HES .....	5
I.3.2. Localisation des HES .....	5
I.3.3. Procédés d'extraction des HES .....	6
I.3.3.1. Macération .....	6
I.3.3.2. Entraînement à la vapeur .....	6
I.3.3.3. Extraction aux solvants .....	7
I.3.4. Variabilité de la composition des HES .....	7
<b>I.4. Formulation galénique des HES : semi-solides</b> .....	<b>8</b>
<b>I.5. L'HE d'<i>O. vulgare</i></b> .....	<b>8</b>
I.5.1. Composition chimique de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> .....	8
I.5.2. Activités biologiques d'HE d' <i>Origanum</i> .....	9

---

I.5.3. Mécanisme d'action antifongique des HEs <i>d'Origanum vulgare</i> .....	9
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes.....</b>	<b>11</b>
<b>II. Matériel végétal.....</b>	<b>11</b>
<b>II.1. Récolte d'<i>Origanum Vulgare</i>.....</b>	<b>11</b>
II.1.1. Identification botanique de la plante .....	11
II.1.2. Extraction de l'huile essentielle <i>d'Origanum vulgare</i> .....	11
II.1.3. Conservation .....	12
II.1.4. Détermination du rendement d'extraction.....	12
II.1.5. Propriétés organoleptiques d'HE d' <i>Origanum vulgare</i> .....	12
<b>II.2. Analyse des constituants chimiques de l'HE par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CPG/MS .....</b>	<b>12</b>
<b>II.3. Formulation d'une pommade à base d'HE d'<i>Origanum vulgare</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>II.3.1. Test d'irritation cutanée .....</b>	<b>15</b>
<b>II.4. Préparation de la solution fongique .....</b>	<b>16</b>
II.4.1. Préparation de l'inoculum fongique.....	16
II.4.2. Evaluation qualitative de l'activité antifongique des HEs d' <i>Origanum vulgare</i> .....	17
II.4.3. Evaluation quantitative de l'activité antifongique des HEs d' <i>Origanum vulgare</i> .....	17
II.4.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	18
II.4.5. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) .....	19
II.4.6. Evaluation de l'activité antifongique de la pommade .....	19

---

<b>II.5. Méthode expérimentale in vivo.....</b>	<b>19</b>
II.5.1. Réactifs chimiques .....	19
II.5.2. Constitution des lots.....	19
II.5.3. Induction d'immunodépression des animaux.....	20
II.5.4. Préparation de l'animal immunodéprimé.....	21
II.5.5. Induction de candidose cutanée.....	21
II.5.6. Prélèvement de candidose .....	21
II.5.7. Application des traitements .....	21
II.5.8. Evaluations cliniques .....	21
<b>II.5.9. Fin d'expérimentation .....</b>	<b>22</b>
<b>II.6. Etude histologiques des lambeaux cutanés.....</b>	<b>22</b>
II.6.1. Fixation .....	22
II.6.2. Inclusion.....	23
II.6.3. L'enrobage .....	23
II.6.4. Coupes, étalement des coupes et coloration .....	24
II.6.5. Montage des lames.....	25
<b>Chapitre III : Résultats et discussion.....</b>	<b>27</b>
<b>III. Extraction et calcul de rendement.....</b>	<b>27</b>
<b>III.1. Rendement d'extraction .....</b>	<b>27</b>
<b>III.2. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle d'<i>Origanum vulgare</i> .....</b>	<b>28</b>

---

<b>III.3. Composition chimique de l'HE</b> .....	<b>28</b>
<b>III.4. Effets de l'huile essentielle d'origan sur la croissance de la souche fongique</b> .....	<b>32</b>
<b>III.5. Formulation</b> .....	<b>33</b>
III.5.1. Diamètre des onguents .....	33
III.5.2. Test d'irritation cutanée .....	35
<b>III.6. Activité antifongique</b> .....	<b>36</b>
III.6.1. Culture fongique .....	36
<b>III.7. Evaluation clinique</b> .....	<b>37</b>
III.7.1. Evaluation pondérale des lots .....	37
III.7.2. Evaluation de la température des lots .....	38
III.7.3. Evaluation de l'état général de tous les lots d'animaux immunodéprimés .....	39
III.7.4. Scores d'évaluation clinique (macroscopique) de tous les lots d'animaux immunodéprimés .....	42
<b>III.8. Etude Histo-pathologique des lambeaux cutanés</b> .....	<b>44</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>47</b>
<b>Référence</b> .....	<b>49</b>
<b>Annexe</b> .....	<b>54</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>60</b>

---



## Liste des tableaux

---

### Liste des tableaux :

<b>Tableau 1:</b> Répartition des lots .....	20
<b>Tableau 2 :</b> Etapes de déshydratation (Inclusion) à l'aide de l'automate Lieca .....	23
<b>Tableau 3:</b> Résultats quantitatifs de l'extraction de l'HE d' <i>O. Vulgare</i> .....	27
<b>Tableau 4:</b> Caractéristiques organoleptiques d' <i>O. Vulgare</i> .....	28
<b>Tableau 5:</b> Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> .....	30
<b>Tableau 9:</b> Diamètres d'halos d'inhibition en mm de la croissance de la souche fongique .....	32
<b>Tableau 10:</b> Détermination de la CMI .....	32
<b>Tableau 11:</b> Détermination de la CMF .....	33
<b>Tableau 6 :</b> Diamètre d'inhibition des pommades formulées.....	34
<b>Tableau 7:</b> Test d'irritation des trois doses de pommade formulée.....	35
<b>Tableau 8:</b> Résultat de la culture fongique moyenne .....	36
<b>Tableau 12:</b> Evaluation de la moyenne des poids des lots.....	37
<b>Tableau 13:</b> Evaluation de la température moyenne des lots.....	38
<b>Tableau 14 :</b> Evaluation de l'état général du lot Témoins positif.....	40
<b>Tableau 15:</b> Evaluation de l'état général du lot Référence.....	40
<b>Tableau 16 :</b> Evaluation de l'Etat général du lot Essai1 0.20% .....	41
<b>Tableau 17 :</b> Evaluation de l'Etat général du lot Essai 2 : 0.25% .....	41
<b>Tableau 18:</b> Evaluation de l'Etat général du lot Témoins positif.....	42
<b>Tableau 19:</b> Evaluation de l'état général du lot Référence.....	42
<b>Tableau 20:</b> Evaluation de l'état général du lot Essai 1 (0.20%) .....	43
<b>Tableau 21:</b> Evaluation de l'état général du lot Essai 2 (0.25%) .....	43
<b>Tableau 22 :</b> Illustration des résultats histopathologies des lambeaux cutanés des différents rats de chaque lot et leur observation .....	44

---

## Liste des figures

---

### Liste des figures :

<b>Figure 1 :</b> Espèce <i>Origanum vulgare</i> .....	4
<b>Figure 2 :</b> Exemples d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes .....	6
<b>Figure 3 :</b> Situation géographique de la station de la récolte (Google maps) .....	10
<b>Figure 4:</b> Feuilles fraîches d' <i>Origanum vulgare</i> .....	11
<b>Figure 5:</b> Equipement, préparation et conservation des deux pommades à base d'huile essentielle de la plante sèche à froid .....	14
<b>Figure 6 :</b> Préparation du lapin en le rasant à ras dans les deux régions (flancs gauche et droit) et Application de la pommade d'HE d' <i>Origanum vulgare</i> formulée .....	16
<b>Figure 7:</b> Sacrifice des animaux et prélèvement des embouts cutanés .....	22
<b>Figure 8:</b> Inclusion des cassettes contenant les fragments : déshydratation et imprégnation en paraffine .....	23
<b>Figure 9 :</b> Appareil d'enrobage, comportant deux compartiments chauds (A, B) et un compartiment froid (c) .....	24
<b>Figure 10:</b> Technique de coupe par un microtome (LEICARM2235) .....	24
<b>Figure 11 :</b> Dépôts du ruban de paraffine à la surface de l'eau de bain marie.....	25
Figure 12 : Coloration des lames.....	25
<b>Figure 13:</b> Observation microscopique des lames .....	26
<b>Figure 14:</b> L'HE obtenue par Hydro-distillation.....	28
<b>Figure 15:</b> Chromatogramme de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> .....	29
<b>Figure 16:</b> Répartition des principales familles de composés de l'HE d' <i>O. Vulgare</i> .....	31
<b>Figure 17 :</b> Quelques structures de substances majeures rencontrées dans les HE d' <i>Origan</i> .....	31
<b>Figure 19 :</b> Détermination de la CMf .....	33

---

## Liste des figures

---

<b>Figure 18:</b> Résultat des tests d'irritations cutanées des trois pommades à 0.34% ; 0.25% ; 0.20% respectivement.....	35
<b>Figure 20 :</b> Evaluation de la moyenne des poids des lots en fonction des jours de traitement .....	38
<b>Figure 21 :</b> Evaluation de la température moyenne des lots en fonction des jours de traitement .....	39
<b>Figure 22 :</b> Evaluation de l'état général du lot Témoin positif en fonction du traitement .....	40
<b>Figure 23:</b> Evaluation de l'état général du lot Référence en fonction du traitement .....	40
<b>Figure 24 :</b> Evaluation de l'état général du lot Essai 1 en fonction du traitement .....	41
<b>Figure 25:</b> Evaluation de l'état général du lot Essai 2 en fonction du traitement.....	41
<b>Figure 26 :</b> Evaluation de l'état macroscopique du lot témoins positif en fonction du traitement .....	42
<b>Figure 27 :</b> Evaluation de l'état macroscopique du lot référence en fonction du traitement.....	42
<b>Figure 28 :</b> Evaluation de l'état macroscopique du lot Essai 1 en fonction du traitement .....	43
<b>Figure 29 :</b> Evaluation de l'état macroscopique du lot Essai 2 en fonction du traitement .....	43

---

## Liste des abréviations

---

### Liste des abréviations :

- **AFNOR** : Association Française de Normalisation.
  - **ADN** : Acide désoxyribonucléique.
  - **CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse.
  - **HE** : Huile Essentielle.
  - **R.t** : Rétention Time.
  - **RHE** : Rendement en Huile Essentielle.
  - **SM** : Spectromètre de Masse.
  - **RE** : Réticulum endoplasmique.
  - **CRD** : Capsule représentative des droits.
  - **CPG** : Chromatographie en phase gazeuse.
  - **MS** : Spectroscopie de masse.
  - **OCDE** : Organisation de coopération et de développement économiques.
  - **UFC** : Unité fongique cellulaire.
  - **CMI** : Concentration minimale inhibitrice.
  - **CMF** : Concentration minimale fongicide.
  - **MH** : Muller Hinton.
  - **AI** : Indice Area.
-

# *Introduction*

# Introduction

---

## Introduction

La phytothérapie est l'art d'utiliser les plantes, qui existe depuis l'Antiquité, considérée comme étant une source de soins, notamment dans les pays en voie de développement [1]. Elle est considérée aussi comme une médecine alternative, efficace et disponible avec moins d'effets secondaires [2].

L'intérêt des substances naturelles dans de nombreux domaines ne cesse de croître car elles représentent une source inépuisable de principes actifs [3]. Ces substances chimiques composées de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les saponines et les huiles essentielles (HEs), représentent un potentiel d'activités qui constitue l'épine dorsale des soins de santé [3].

Au cours de ces dernières années, l'intérêt de la recherche pour les substances naturelles reste l'objet de nombreuses études *in vivo* et *in vitro*. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus de procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale [4].

Les HEs représentent un groupe très intéressant doté de propriétés antimicrobiennes, anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératrices et antifongiques [5]. Ceci les rend intéressant comme nouveau produit qui peut remplacer les molécules synthétiques douées des mêmes propriétés.

Nous avons constaté qu'en termes d'évaluation de l'activité antifongique *in vivo*, il n'existe aucune étude faisant référence, et compte tenu de l'importance et l'abondance des Lamiacées en métabolites secondaires et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, nous nous sommes intéressés à une espèce de cette famille qui est « *Origanum vulgare L* », de la région de Tizi Ouzou [6].

Pour cela, dans ce travail nous avons mis en lumière les travaux scientifiques et rigoureux concernant l'efficacité antifongique de l'huile essentielle d'origan sur le *Candida albicans*.

Afin d'étudier l'activité anti-fongique de cette plante, nous avons réalisé une extraction de son huile essentielle à partir des parties aériennes, et la préparation d'une forme galénique à usage externe à base de ses HEs [6].

Ce mémoire est composé de deux parties La première partie propose une mise au point bibliographique. Elle est divisée en deux chapitres.

## Introduction

---

Le premier chapitre rassemble des données bibliographiques et des généralités sur les plantes médicinales et sur la plante étudiée (*Origanum vulgare*). Le second chapitre est consacré en premier lieu à l'étude des huiles essentielles en général, leur classification, répartition, utilisation et leur extraction ; en second lieu à l'étude des HEs d'*Origanum vulgare* et le champignon *Candida albicans*.

Dans la seconde partie (pratique), on a décrit en détail le matériel végétal, l'extraction de l'huile essentielle, l'analyse chimique de l'huile essentielle, formulation d'une pommade et enfin l'étude de son activité biologique in-vivo et in-vitro.

Les résultats ainsi obtenus sont décrits et minutieusement discutés. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale, les annexes et la liste des références bibliographiques ainsi qu'un résumé.

*Chapitre I :*

**Revue bibliographique**



## Chapitre I : Généralités, Huiles essentielles, Espèces « *Origanum Vulgare L* »

### I. Généralités :

Une Plante médicinale est toute plante ou partie de plante à usage médicinal destinées pour les préparations galéniques (décoctions, infusions, etc.), drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses qu'on utilise encore bien en médecine classique qu'en phytothérapie [7].

Ces substances sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles ou pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques. Qui peuvent donc agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme animal et humain [8].

Ces plantes sont une source potentielle de substances actives qui ont la capacité à produire différentes entités chimiques actives par le métabolisme secondaire, distribuées sur toutes les parties de la plante inégalement selon leur rôle [9].

#### I.1. La Famille des lamiacées :

La famille des Lamiacées comprend 264 genres et 6990 espèces d'herbes, parfois arbre ou arbustes, habituellement aromatiques et riches en huiles essentielles due à la présence de « réservoirs » sous-cuticulaires constitués par des poils glanduleux qui emmagasinent et secrètent les essences [14].

Elle est distribuée dans les différentes zones tempérées du monde entier, mais concentrées en grande partie dans la région méditerranéenne [15].

En Algérie, 145 espèces sont répertoriées dans tous les territoires aussi bien sahariens, arides qu'humides. Ces espèces sont réparties en 28 genres [16].

#### I.2. *Origanum vulgare* :

L'Origan est reconnu en arabe sous la dénomination de Zaâter. Cependant, il y a lieu de signaler que cette dernière dénomination est peu précise. Le terme Zaâter, englobe en fait diverses plantes aromatiques de la famille des Lamiacées (Origan, Thym...) [63].

C'est une plante aromatique odorante, appartenant à la famille des Lamiacées, qui pousse spontanément dans le nord de l'Afrique ; généralement dans les montagnes et les endroits rocheux et calciques, très commune dans les endroits secs et ensoleillés à une altitude de 300 à 1600m [17,18].

## Revue bibliographique

---

*L'Origanum vulgare* est une plante herbacée vivace de la classe des dicotylédones qui mesure de 30 à 80 cm de haut, au feuillage et aux fleurs odorantes quand on les froisse. Et ainsi reconnaissable à son odeur et à sa saveur phénolée et épicée [19] ; peu rougeâtre violacée couverte de poils, qui possède de nombreuses tiges dressées à la section carrée et ramifiée. Ces tiges peuvent persister en hiver à l'état sec [20].



Figure 1 : Espèce *Origanum vulgare* [62].

### I.2.1. Classification botanique de l'*Origanum vulgare* : [20]

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Gamopétales
- Série : Superovariées tétracycliques
- Super ordre : Tubiflorales
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiaceae
- Sous-famille : Népétoïdées
- Genre : *Origanum*
- Espèce : *Origanum vulgare* L (Zaater).

# Revue bibliographique

---

## I.2.2. Historique :

L'origine étymologique du mot « Ori-ganos » signifie éclat de la montagne. Il désigne également une plante d'un parfum pénétrant [10].

L'Origan est considéré comme panacée car on l'utilisait comme anti-infectieux et bactéricide ; il est aussi utilisé pour soigner les infections respiratoires mais aussi diverses maladies de peau [11].

En outre, l'Origan était déjà connu de l'Égypte des pharaons pour ses vertus antiseptiques. Les médecins chinois utilisèrent pendant des siècles l'Origan pour soigner divers maux [13].

Au moyen âge, les pèlerins mettaient de l'Origan dans leurs chaussures pour soulager leurs pieds, tout comme les centurions romains qui connaissaient déjà les propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires de cette plante [13]

## I.3. Définition des huiles essentielles :

Une HE est un produit de composition complexe qui renferme des principes volatils contenus dans les végétaux. Selon l'AFNOR (Association française de normalisation), elle désigne un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques: soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certain agrume, soit par distillation sèche [21].

### I.3.1. Propriétés physico-chimiques des HEs :

On trouve généralement les HEs incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire. Les HEs sont :

- Odorantes et volatiles ;
- Inflammables ;
- De densité inférieure à 1 ;
  - Peu solubles dans l'eau et solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques ;
  - Altérables et très sensibles à l'oxydation [22].

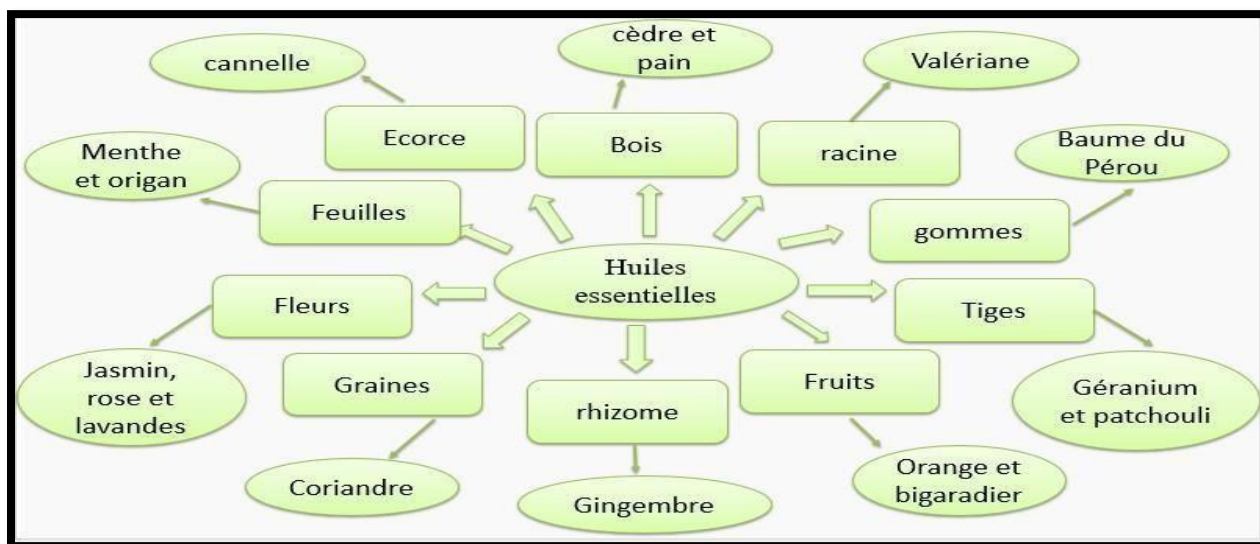
### I.3.2. Localisation des HEs :

Toutes les plantes ont potentiellement la capacité de produire des essences ; les plantes dites "aromatiques" sont celles qui en produisent en quantité relativement importante [23].

## Revue bibliographique

---

Il existe 17 500 espèces aromatiques réparties en une cinquantaine de familles, et sont caractérisées par la présence d'organes spécifiques responsables de la synthèse et du stockage des huiles [23].



**Figure 2 :** Exemples d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes [23].

### I.3.3. Procédés d'extraction des HEs :

Il existe plusieurs méthodes pour l'extraction des HEs. Les principales sont basées sur l'entraînement à la vapeur, l'expression, la solubilité et la volatilité [24].

Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées [24].

#### I.3.3.1. Macération

Mettre la plante à froid dans un liquide (eau, vin, alcool, huile). Elle peut aussi être utilisée fraîche ou en solution dans l'alcool, dans du miel ou dans la glycérine. Le temps de macération dépend de la plante (rarement plus de 10 heures) [25].

#### I.3.3.2. Entraînement à la vapeur

La plupart des huiles essentielles sont obtenues par distillation et entraînement à la vapeur d'eau. Trois variantes sont possibles selon la texture et la fragilité de la matière à traiter [26].

- Hydro-distillation simple, où la plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est ensuite porté à ébullition. La vapeur saturée en huiles essentielles traverse un serpentin où elle se condense pour donner deux produits : l'eau florale et l'huile essentielle, cela par différence de densité [26].
- Distillation à vapeur saturée dans laquelle le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau. Il est placé sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. Les composés volatils entraînés par la vapeur d'eau vont pouvoir être séparés par décantation du distillat refroidi [27].
- Hydro-diffusion qui consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale. La composition des produits obtenus est sensiblement différente sur le plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes [26].

### I.3.3.3. Extraction aux solvants

Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'inconvénient de ces extractions est leur manque de sélectivité ; de ce fait, de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure [28].

D'autres techniques d'extraction existent, parmi-elles on trouve : [29]

- **Extraction par enfleurage ;**
- **Extraction par CO<sub>2</sub> supercritique ;**
- **Extraction par micro-ondes ;**
- **Expression à froid.**

### I.3.4. Variabilité de la composition des HEs :

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions intrinsèques et extrinsèques [30].

- **Facteurs intrinsèques**

Les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des HEs sont le stade végétatif, l'organe de la plante, les hybridations, les facteurs de mutation et le polymorphisme chimique « formes physiologiques » [31].

- **Facteurs extrinsèques**

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles, ainsi que, la température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques (sol) [32].

#### **I.4. Formulation galénique des HES : semi-solides**

La Pharmacopée Européenne indique que les préparations semi-solides sont des préparations présentant un aspect homogène, destinées à être appliquées sur la peau ou sur certaines muqueuses, formulée en vue d'une action locale, transdermique, émolliente et protectrice de principe actif. Elles regroupent les pommades, pates, gels, et les émulsions [44].

- **Pommade :**

Sont des préparations composées d'un excipient monophasé dans lequel peuvent être dissoutes ou dispersées des substances liquides ou solides. Elles sont d'aspect crémeux, réalisées à base d'huile essentielles ou de tout autre corps gras, dans laquelle les principes actifs des plantes sont dissous [45].

#### **I.5. L'HE d'*O. Vulgare***

L'Origan a toujours été utilisé comme un remède traditionnel pour traiter diverses affections comme la toux convulsive, les troubles digestifs et les problèmes menstruels [33]. Les HEs et les extraits d'espèces d'Origan sont largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique, et comme aromatisants et préservateurs dans plusieurs produits alimentaires [33].

##### **I.5.1. Composition chimique de l'HE d'*Origanum vulgare***

Aujourd'hui, il y a un certain nombre de publications se rapportant à la composition chimique de l'Origan utilisées dans la classification des espèces du genre *Origanum*, autre que la révision de Letswaart (1988).

L'Origan est connu largement dans le monde des herbes et des épices pour ses huiles volatiles riches en monoterpènes phénoliques principalement le carvacrol, parfois thymol et d'autres composés présent dans l'Origan sont habituellement de moins d'importance quantitativement tels que des monoterpènes acycliques comme, géraniol, acétate géranylique, linalool, acétate linalylique et  $\beta$ -myrcène et des composé

bornanes tels que le camphène, camphre, bornéol, bornyle et acétate d'isobornyle.

En outre, quelques sesquiterpènes, tels que le caryophyllène bisabolène, bourbonnène, germacrene-D, humulène, muurolène, muurolène,  $\gamma$ -cadinène,  $-\alpha$ -copaène,  $\alpha$ -cadinol, et l'oxyde de caryophyllène. [34].

### **I.5.2. Activités biologiques d'HE d'*Origanum***

- Activité antioxydante [36] ;
- Activité antispasmodique et urolithique [35] ;
- Activité anti-glycémique [37] ;
- Activité anti-inflammatoire [36] ;
- Activité antiparasitaire [35] ;
- Activité nématocide [37].
- Activité antibactérienne et antifongique [35].

### **I.5.3. Mécanisme d'action antifongique des HEs d'*Origanum vulgare***

Le carvacrol est le principal composé de l'origan qui pourrait agir par perturbation et dépoliarisation de la membrane plasmique en ciblant les protéines membranaires et les cibles médicamenteuses intracellulaires [41].

Aussi, une autre étude sur *Candida albicans* montre que le carvacrol pourrait être un facteur de stress du réticulum endoplasmique (RE). Le RE des cellules traitées au carvacrol est fragmenté, entraînant la perturbation de l'organisation du RE et de la réponse protéique dépliée, en activant les gènes impliqués dans la protéolyse, le métabolisme des acides aminés, la translocation des phospholipides, la réponse au stress oxydatif et le mécanisme de réparation de l'ADN, et en inhibant les gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes, la glycosylation, le transport des sucres, l'exportation de médicaments et l'importation nucléaire [42].

L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la cellule. En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des cellules [43].

*Chapitre II :*  
*Matériel & Méthodes*



## Chapitre II : Matériel et méthodes

### II. Matériel végétal

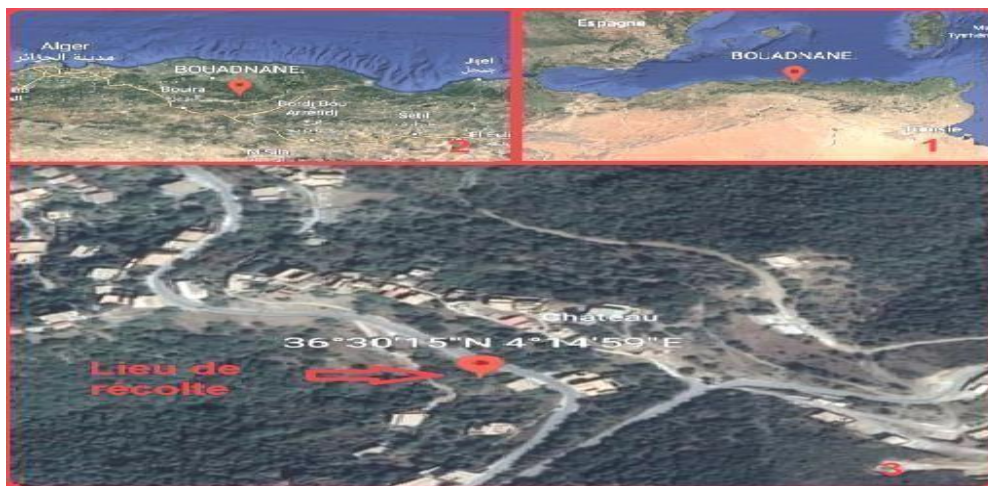
L'étude est portée sur l'huile essentielle des feuilles d'une espèce de la famille des Lamiacées qui est *Origanum vulgare* L.

Les feuilles fraîches de la plante présentent une odeur fraîche et légèrement poivrée, phénoliques, peu agréable caractéristique, et d'une couleur vert foncé.

Dans notre étude, nous avons utilisé les deux états de la drogue végétale : sèche et humide coupée en petits morceaux écrasés.

#### II.1. Récolte d'*Origanum vulgare*

La récolte des plantes de l'espèce d'*Origanum vulgare* a été réalisée le mois de Mai 2022 pendant sa période de floraison dans la région du village Bouadnane, commune Iboudrarene– Tizi Ouzou **Figure 2**. Le prélèvement a été fait manuellement le mardi 14 Mai à 6H du matin.



**Figure 3 :** Situation géographique de la station de la récolte (Google maps).

##### II.1.1. Identification botanique de la plante

L'identification botanique a été faite avec l'aide du Dr Adjaoud, enseignant au sein de la faculté de biologie à l'université de Bejaia.

Les feuilles récoltées fraîches **Figure 4**, ont été mises à l'abri de la lumière à une température ambiante pendant une journée avant de les mettre en extraction.



**Figure 4:** Feuilles fraîches d'*Origanum vulgare*.

### **II.1.2. Extraction de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare***

L'huile essentielle des feuilles d'*Origanum vulgare* est extraite par le procédé d'hydro-distillation avec un appareil du type Clevenger (1928) (**voir annexe**), qui est constitué d'un chauffe ballon et un ballon en verre pyrex où l'on place la matière végétale et l'eau distillée, et une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant).

#### **• Protocole :**

Une quantité de 300 g de feuilles de la plante d'*Origanum vulgare* sont émiettées, puis introduites dans un ballon monocol de 2 L, ensuite une quantité suffisante d'eau distillée a été ajoutée.

Le mélange est porté en ébullition à l'aide de chauffe ballon pendant 2 h. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical, puis dans le lieu de condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans un collecteur. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau surnage à la surface de cette dernière. Après l'apparition de deux phases, l'une est organique (huile essentielle) et l'autre est aqueux (hydrolat) dans l'ampoule à décanter (Voir annexe). L'huile ainsi obtenue est récupérée par décantation. Le distillat est recueilli dans le collecteur (flacon en verre) et l'huile essentielle des feuilles d'*Origanum vulgare* est récupérée par la suite dans un tube approprié [8].

**II.1.3. Conservation :**

L'huile essentielle obtenue de l'espèce *Origanum vulgare* a été conservée dans un tube en verre stériles fermés hermétiquement, couvert d'un papier aluminium à l'abri de la lumière, et à une température de 4°C dans un réfrigérateur.

**II.1.4. Détermination du rendement d'extraction**

La norme AFNOR, définit le rendement en huile essentielle (RHE), comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M) [61]. Il est donné par la formule suivante :

$$\text{RHE} = (M'/M) * 100$$

- RHE : Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage (%) ;
- M' : Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g);
- M : Masse de la matière végétale utilisée en gramme (g) et qui vaut 100 g.

**II.1.5. Propriétés organoleptiques d'HE d'*Origanum vulgare***

Les différentes caractéristiques organoleptiques (odeur, couleur, aspect) de l'HE d'*Origanum vulgare* ont été observées avec mon professeur et nos collègues.

**II.2. Analyse des constituants chimiques de l'HE par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CPG/MS****➤ Principe :**

La CPG est l'une des techniques les plus utilisées en analyse quantitative et qualitative. Elle s'est répandue de par son coût relativement modéré ou encore ses possibilités d'automatisation, Le couplage CPG/MS permet ainsi une approche plus précise de nombreuses applications du secteur agro-alimentation et la technique de référence dans le domaine des HEs. Il permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse de différents constituants d'un mélange complexe [46,47].

**➤ Protocole :**

L'analyse quantitative l'HE d'*O. Vulgare* a été réalisée, au laboratoire d'analyse de Sonatrach (Boumerdès) à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Agiles technologies 5977A MSD, par injection de 0,2µl d'extrait. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium (He) d'un débit de 0,3ml/min.

La colonne utilisée est une colonne capillaire standard non polaire, de 60 m de longueur et de 0,22 mm de diamètre. L'épaisseur de la phase stationnaire est de 0,25 µm ; la programmation de la température de la colonne initiale d'injection est de 60°C pendant 2,50min, puis s'élève par palier jusqu'à 300°C; le détecteur utilisé pour cette analyse est de type spectrométrie de masse Agiles. L'appareil est piloté par un ordinateur muni d'un logiciel approprié pour ce genre d'analyse et d'une banque de données qui permet l'identification des composés.

L'identification des entités chimiques séparées par les huiles essentielles a été évaluée en comparant leurs indices de rétention arithmétiques (indice de Kovat) avec les valeurs rapportées dans la littérature, principalement la bibliothèque **d'Adams (2007) [9]**, et également en faisant correspondre leurs spectres de masse correspondants avec ceux de la banque de données du logiciel de l'instrument. et les temps de rétention correspondants ont été enregistrés et utilisés pour calculer l'indice arithmétique de Kovat pour chaque élément essentiel. Selon l'équation de Van den Dool et Kratz.

$$RI_x = 100 n + 100 (t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n)$$

- $t_{n+1}$  et  $t_n$  : temps de rétention des hydrocarbures n-alcanes de référence en éluant immédiatement avant et après le composé "X"
- $t_x$ : temps de rétention du composé "X"

**II.3. Formulation d'une pommade à base d'HE d'*Origanum vulgare***

- Préparation de 100g de pommade à chaud en premier lieu avec une concentration en huile d'Origan égale au rendement de la plante fraîche.

**➤ Constituant de la formulation**

- ✓ 60% de vaseline blanche ;
  - ✓ 20% d'huile de vaseline ;
  - ✓ 10% d'alcool cétostéarilique ;
  - ✓ 15% de myristate d'isopropyle ;
-

- ✓ 0,34g d'huile essentielle extraite à partir de plante fraîche.

### ➤ Protocole

Faire fondre les matières grasses sur une plaque chauffante sous agitation pour une bonne homogénéisation. Retirer le mélange et agiter jusqu'à refroidissement total à l'air. Ajout de la matière active et le myristate d'isoproyle au mélange de vaseline épaisse sous agitation, puis faire passer la pommade dans l'homogénéisateur pendant 4mn. Conditionnement dans des boîtes hermétiques, à une température de 4°C.

- Préparation de deux autres pommades de 50 g à des concentrations respectivement de 0,25% et 0,20% d'huile essentielle de la plante sèche à froid.

### ➤ Constituants de la formulation

- ✓ 35% de vaseline blanche ;
- ✓ 10% d'huile de vaseline ;
- ✓ 4,87 % de miristate d'isopropyle avec 0,125% de l'huile essentielle pour la 1<sup>ère</sup> concentration ;
- ✓ 4,9% de miristate d'isopropyle avec 0,1% de l'huile essentielle pour la 2<sup>ème</sup> concentration.

### ➤ Protocole

La préparation est faite à froid et manuellement à l'aide d'un mortier et un pilon, cette méthode est représentée dans la **figure 5**.



**Figure 5:** Equipement, préparation et conservation des deux pommades à base d'huile essentielle de la plante sèche à froid.

**II.3.1. Test d'irritation cutanée****• Matériel animal**

Des lapins albinos néo-zélandais (mâles) pesant entre 1kg à 2,5kg, ont été utilisés pour l'étude.

Les lapins ont été maintenus dans des cages individuelles, dans des conditions d'hébergement standard.

**• Protocole**

L'étude expérimentale est caractérisée par deux phases essentielles consécutives : l'étape initiale et l'essai confirmatoire ; réalisée selon la méthode décrite par la ligne directrice de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) [60].

Les animaux sont préparés la veille de l'essai, en les rasant à ras dans les deux régions (flancs gauche et droit).

**• Etape initiale**

La partie du flanc gauche du 1<sup>er</sup> lapin est divisée en 3 compartiments différents et le flanc droit reste sans aucune application. Trois tests successifs à temps bien précis sont appliqués sur chaque compartiment comme suit :

- 1<sup>er</sup> timbre : une dose de 0,5g de pommade d'HE d'*Origanum vulgare* est étalée délicatement sur toute la zone délimitée, recouvrir la zone avec une compresse stérile puis appliquer le sparadrap pendant 3mn et passer à l'observation.
- 2<sup>ème</sup> timbre : une dose de 0,5g de pommade d'HE d'*Origanum vulgare* est étalée de la même manière sur le 2<sup>ème</sup> compartiment, recouvrir avec une compresse stérile puis appliquer le sparadrap pendant 1h et passer à l'observation.
- 3<sup>ème</sup> timbre : une dose de 0,5g de pommade d'HE d'*Origanum vulgare* est étalée de la même manière sur le 3<sup>ème</sup> compartiment, recouvrir avec une compresse stérile puis appliquer le sparadrap pendant 4 h et passer à l'observation.

**• Essai confirmatoire**

Le test est confirmé sur des lapins supplémentaires avec un seul timbre maintenu durant 4h dans le cas où l'étape initiale ne révèle pas d'effets corrosifs, et faire l'observation.

Prolonger les observations au bout de 24h, 48h et 72h après enlèvement des timbres comme représenté dans la **Figure 6** ci-dessous.





**Figure 6 :** Préparation du lapin en le rasant à ras dans les deux régions (flancs gauche et droit) et application de la pommade d'HE *d'Origanum vulgare* formulée.

#### II.4. Préparation de la solution fongique

L'étude Microbiologique a été réalisée selon un mode opératoire interne CRD-SAIDAL.

##### • Matériel :

###### ➤ Petit matériel :

Bec benzène, boîte pétri, compresses stériles, pipette pasteur, milieu de culture (sabouraud Chloramphénicol).

###### ➤ Matériel animal :

Des Rats albinos (males) pesant entre  $200 \pm 30$ g, ont été utilisés pour cette étude.

Les Rats ont été maintenus dans des cages individuelles, dans des conditions d'hébergement standard.

#### II.4.1. Préparation de l'inoculum fongique

Les suspensions mères de levures sont préparées à partir d'une culture jeune de 48h de *Candida albicans* incubées à  $37^{\circ}\text{C}$ , en prélevant des colonies bien isolées et identiques qu'on introduit dans un tube contenant 5ml d'eau physiologique stérile, puis agiter au vortex quelques secondes.

Réaliser une lecture de la transmittance avec spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620nm qui doit être entre (2% et 3%) ce qui correspond à une concentration de  $10^8$  à  $10^7$ UFC.

**II.4.2. Evaluation qualitative de l'activité antifongique des HEs d'*Origanum vulgare*****• Préparation de la 1<sup>ère</sup> couche du milieu :**

- Faire fondre le milieu gélose Muller–Hinton et le sabouraud chloramphénicol dans un bain-marie à 95°C ;
- Verser aseptiquement une première couche dans les boites pétris à raison de 15ml par boite avec 02 répétitions par souche ;
  - Laisser refroidir et solidifier sur la paillasse.

**• Préparation de la 2<sup>ème</sup> couche du milieu :**

- Faire fondre le milieu gélose Muller–Hinton et le sabouraud chloramphénicol dans un bain-marie à 95°C
  - Baisser la température à 45°C ;
  - Remplir les flacons en verre stériles avec 50ml de sabouraud chloramphénicol ;
  - Ensemencer les milieux de cultures avec 200µl de chaque suspension ;
  - Agiter manuellement les flacons ;
  - Transvaser rapidement 4ml de chaque milieu inoculé en 2<sup>ème</sup> couche sur la surface des boites contenant déjà la 1<sup>ère</sup> couche ;
  - Etaler rapidement en faisant pivoter la boite pétrie sur elle-même pour avoir une surface uniforme;
  - Laisser solidifier sur la paillasse.
- Dépôt des disques :**

- A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque stérile, l'imbiber avec l'HE d'Origan en le mettant en contact avec le bout du disque qui va absorber progressivement jusqu'à imprégnation total du disque.

**II.4.3. Evaluation quantitative de l'activité antifongique des HEs d'*Origanum vulgare***

L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de dilution en milieu solide pour déterminer les taux d'inhibition de la croissance et en milieu liquide pour déterminer la CMI.

**• Principe de L'AROMATOGRAMME :**



Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des HEs, préalablement sélectionnées et reconnues. L'aromatogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode de disques est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des fonges vis-à-vis d'une substance réputée antifongique.

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des HEs à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide (Saboraud chloramphénicol, Mueller Hinton).

#### **II.4.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La CMI: c'est la concentration minimale pour laquelle on ne note aucune croissance visible des moisissures.

- Préparer une suspension de  $10^4$ UFC/ml de la levure à étudier ;
- Préparer le M H avec 0.5% de Tween 80 et ce, après stérilisation du milieu ;
- Préparer deux séries de dilutions de l'huile essentielle à étudier allant de 1 jusqu'à 0.0075% dans les milieux précités ;
- Réalisation des dilutions se fait comme suit :
- Diluer 1ml d'huile essentielle dans 50ml de milieu dans un premier flacon, ce qui donne la dilution à 1% ;
- Verser la moitié du premier flacon dans un deuxième et ajuster à 50ml pour obtenir la dilution à 0,5% ;
- Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0.0075% ;
- Verser 15 ml de chaque dilution dans 02 boites de Pétri ;
- Faire sécher les boites ;
- Déposer les différentes dilutions à raison de  $1\mu\text{l}$  des suspensions fongiques à  $10^4$ UF/ml par spotage et à l'aide de micro seringue ;
- Préparer des boites témoins (positifs) contenant le milieu MH avec Tween sans l'huile essentielle;
- Incuber les boites de Pétri à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 à 48h.

**II.4.5. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF)**

La lecture s'effectue à l'œil nu, en déterminant la plus petite concentration de l'huile essentielle ou l'extrait naturel de plante où aucune croissance de souche testée n'est observée sur les disques.

**II.4.6. Evaluation de l'activité antifongique de la pommade**

- Préparation de la première et deuxième couche de gélose ;
- Effectuer des puits à l'aide d'un embout de micropipette ;
- Mettre une quantité de pommade référence dans le puits ;
- Mettre une quantité des deux doses de pommade formulée ;
- Incuber pendant 48h à 37° C.

**II.5. Méthode expérimentale in vivo**

L'étude expérimentale a été réalisée selon un mode opératoire interne CRD-SAIDAL

**II.5.1. Réactifs chimiques****• Médicaments :**

Anesthésiant : kétamine + xylazine ; Crème dermique econazole 1% ; Dexamétazone.

**• Petit matériel :**

Seringues, écouvillons stériles, compresses stériles, pansements occlusifs stériles, trousse et planche à dissection, boîtes de pétrie; loupe et pierre ponce.

**• Equipement :**

Balance analytique ; balance pour animaux ; tondeuse électrique.

**II.5.2. Constitution des lots**

La veille de l'expérimentation :

- Peser les animaux, faire une identification au niveau de la queue avec un feutre indélébile ;
- Mettre les animaux dans des cages individuelles ;
- Etiqueter les cages ;

La répartition est faite ainsi **Tableau 1** :

**Tableau 1:** Répartition des lots

	<b>Lots Témoins négatifs</b>	<b>Lots témoins positifs</b>	<b>Lots références</b>	<b>Lots essai1</b>	<b>Lots essai2</b>
<b>Nombre d'animaux</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>	<b>n=5</b>

- Groupe témoin négatif (T-) : groupe d'animaux ne recevront aucun inoculum fongique ni de traitement
- Groupe témoin positif (T+): groupe d'animaux recevront des injections de dexaméthasone, application d'inoculum fongique sans aucun traitement.
- Groupe référence (Réf) : groupe d'animaux recevront des injections de dexaméthasone, application d'inoculum fongique et un traitement à base de crème dermique éconazole (Phanazol) 1%.
- Groupe essai 1 (E1) : groupe d'animaux recevront des injections de dexaméthasone, application d'inoculum fongique et un traitement à base de l'onguent formulé à 0,20% d'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.
- Groupes essais 2 (E2) : groupe d'animaux recevront des injections de dexaméthasone, application d'inoculum fongique et un traitement à base de l'onguent formulé à 0,25% d'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.

### II.5.3. Induction d'immunodépression des animaux

Des rats albinos mâles immunodéprimés ont été utilisés pour induire une infection cutanée afin de tester les effets de la formulation sélectionnée dans la prévention et le traitement d'une atteinte cutanée fongique profonde.

Au début de l'étude, administrer à tous les lots d'animaux mis en expérimentation. La Dexaméthasone injectable à 4mg/ml en intra-péritonéale (IP) sauf au lot témoin (T-) pendant 3 jours, aux 4<sup>ème</sup> jours augmenter la dose d'immunosuppresseur à 5mg/ml.

**II.5.4. Préparation de l'animal immunodéprimé**

- Anesthésier les animaux ;
- Raser la dorsale de l'animal environ 4 cm<sup>2</sup>, délimiter la zone dénudée pour recevoir l'inoculum ;
- Frotter la peau avec la pierre ponce pour stresser cette dernière ;
- Faire quelques scarifications afin de permettre la pénétration de la souche comme représenté dans la figure.

**II.5.5. Induction de candidose cutanée**

- Imbiber les écouvillons stériles de la solution de *Candida albicans* préparé ultérieurement ;
- Au milieu de la zone rasée, appliquer 100 µl de suspensions de *Candida albicans* ;
- Frotter sur la partie dorsale dénudée et délimitée afin de pénétrer la souche fongique à travers la peau.
- Mettre un pansement occlusif stérile pendant 48 h sur la zone contaminée.

**II.5.6. Prélèvement de candidose**

- Faire des grattages de la partie contaminée avec des écouvillons stériles 48 h après l'induction, milieu et à la fin de l'expérimentation ;
- Faire un examen microbiologique (voir méthode).

**II.5.7. Application des traitements**

Après 48 h d'induction de la pathologie sur des rats immunodéprimés et les premiers résultats microbiologiques obtenus, commencer le traitement pendant 10 jours (voir répartition).

**II.5.8. Evaluations cliniques**

- Faire une évolution pondérale de tous les animaux durant toute la période d'expérimentation à J0, J5, J7, J12, J16.
- Prendre la température des animaux immunodéprimés afin de prévoir une éventuelle infection J5, J12, J16.
- Faire une évaluation de l'état général de l'animal durant l'expérimentation.

- Faire une étude clinique tout au long de la période du traitement.
- Remplir les tableaux cliniques.

### II.5.9. Fin d'expérimentation

Après 10 jours de traitement, une fois les résultats de microbiologie sont obtenus suite au dernier grattage, procéder au sacrifice des animaux anesthésiés par dislocation cervicale.

- Prélever un lambeau cutané de chaque rat choisi par lot. Mettre ces derniers dans des caissettes et dans du formol à 10% pour une étude histopathologique comme représenté dans la **Figure 7**.



**Figure 7:** Sacrifice des animaux et prélèvement des lambeaux cutanés.

### II.6. Etude histologique des lambeaux cutanés

Les techniques histologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de cytologie et d'anatomie pathologique de l'université de Bejaia, faculté de médecine.

Les lambeaux cutanés prélevés de chaque rat des lots sont soumis à un examen macroscopique afin de les préparer aux différentes étapes suivantes :

#### II.6.1. Fixation

La fixation est immédiate après le prélèvement pour empêcher une altération microbienne des tissus ou par autolyse, ainsi garder les constituants cellulaires dans un état le plus proche des tissus vivants. Le volume du fixateur (formaldéhyde) doit être 20 à 50 fois celui du prélèvement [47].

### II.6.2. Inclusion

Le mode d'inclusion à la paraffine est le plus répandu. La paraffine est un mélange d'hydrocarbures saturés et quelque fois de cires qui ne sont pas miscible à l'eau.

Pour cela, les pièces fixées doivent être déshydratées. Le déshydratant le plus utilisé est le xylène car c'est un liquide intermédiaire miscible à l'alcool et à la paraffine, mais aussi un éclaircissant ; ce qui permet d'apprécier le degré de pénétration par la transparence acquise par les pièces après l'inclusion [48]. La succession de toutes ces étapes est facilitée par un automate à inclusion représenté par la **Figure 08 et Tableau 2**.

**Tableau 2 :** Etapes de déshydratation (Inclusion) à l'aide de l'automate Lieca.

Etapes	Produit	Durée
1 <sup>er</sup> bain	formol	1h30
2 <sup>ème</sup> bain	Alcool 95%	1h30
3 <sup>ème</sup> bain	Alcool 95%	1h30
4 <sup>ème</sup> bain	Alcool 100%	2h
5 <sup>ème</sup> bain	Acétone I	1h30
6 <sup>ème</sup> bain	Acétone II	1h30



**Figure 8:** Inclusion des cassettes contenant les fragments : déshydratation et imprégnation en paraffine.

### II.6.3. L'enrobage

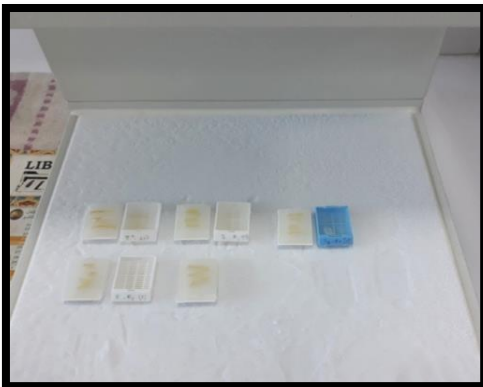
L'enrobage se fait grâce à un appareil comportant, trois compartiments (A, B, C), deux chauds et un compartiment froid. À l'aide du moule métallique, les cassettes seront remplies par la paraffine chaude, puis refroidie au niveau du compartiment froid **Figure 9**.



**Figure 9 :** Appareil d'enrobage, comportant deux compartiments chauds (À, B) et un compartiment froid (c).

#### II.6.4. Coupes, étalement des coupes et coloration

Microtome model (LEICA) permet d'obtenir des coupes dont l'épaisseur est de 3 à 5 $\mu$ m (**Figure 10**). La coupe proprement dite s'obtient par passage régulier de la pièce à couper devant la lame du microtome. Réaliser des coupes sériées, disposées en forme de ruban.



**Figure 10:** Technique de coupe par un microtome (LEICARM2235).

Les rubans de paraffine obtenus sont plissés et doivent être étalés sur un milieu liquide légèrement chauffé à l'aide d'un bain marie afin que les plis disparaissent et que la coupe acquière une planéité parfaite, démontré par la **Figure 11**.



**Figure 11 :** Dépôts du ruban de paraffine à la surface de l'eau de bain marie.

Le collage des coupes se fait sur une lame de verre. Les coupes égouttées et mises dans des portoirs sont ensuite séchées dans une étuve jusqu'au moment de la coloration **Figure12**. La paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage avec le xylène pendant 20mn et de réhydratation avec l'éthanol pendant 20mn. La coloration se fait dans des bains successifs d'Hématoxyline ; Eau courante ; Eosine alcoolique puis eau courante.



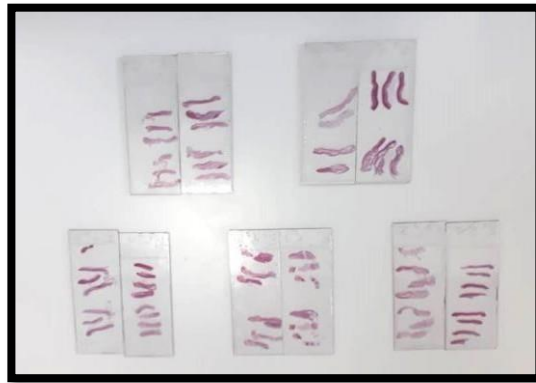
**Figure 12 :** Coloration des lames.

### II.6.5. Montage des lames

Après coloration une goutte d'Eukitt de montage (colle à base de résine) est disposée sur la coupe **Figure 13**, une lamelle est appliquée de façon à ce que la résine recouvre l'ensemble de la coupe. Lors de la manipulation, aucune bulle d'air ne doit s'insérer entre la lame et la lamelle.



Laisser sécher à l'aire pendant quelques minutes et passer à l'observation microscopique.



**Figure 13:** Observation microscopique des lames.

***Chapitre III :***  
***Résultats & discussion***

### Chapitre III : Résultats et discussion

#### III. Extraction et calcul de rendement

##### III.1. Rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction de l'HE d'*Origanum vulgare* a été calculé par rapport à la matière végétale fraîche, exprimé en grammes par 100 g, le rendement obtenu est de **0.34%**.

Le **Tableau 3** regroupe les rendements calculés pour l'HE étudiée dans ce travail ainsi que ceux de la même espèce poussant en Algérie, au Maroc et en Tunisie

**Tableau 3:** Résultats quantitatifs de l'extraction de l'HE d'*O. Vulgare*

Origine Espèces	Rendement %			
	Ce travail (Tizi-ouzou)	Algérie (Guelma)	Maroc	Tunisie
<i>O. vulgaire L</i>	0,34	2,52	1,15	0,1-0,7

Nous avons observé une différence entre les rendements d'extraction, de l'espèce étudiée dans ce travail. En effet, *L'O.vulgare* étudié, possède un rendement relativement faible de (0,34%) comparé à celui trouvé par **Derwich et al (2010) [49]** Avec l'Origan du Maroc (1,15%) et celui de la Tunisie (0,1- 0,7%). Le rendement le plus élevé a été obtenu par **Bouhaddouda et al (2016) [18]** qui a travaillé sur la même sousespèce (*O. vulgare glandulosum*) poussant dans le même biotope (Nechmaya, Guelma) avec une valeur de rendement de 2,52%.

La différence existante entre les rendements d'extraction obtenus est probablement liée à la variation des procédés de manipulation, par exemple ; le temps de l'hydro-distillation ; la durée de séchage ; le rapport eau/matière végétale et la température de chauffage [47].

Elle peut être liée, également aux facteurs climatiques (chaleur, froid, stress hydrique), facteurs géographiques (altitude, nature du sol, taux d'exposition au soleil) et génétiques (croisements naturels) [50].

### III.2. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*

L'HE obtenue par hydro-distillation est de couleur jaune, elle a une saveur fortement piquante et une odeur forte caractéristique des plantes aromatiques en **Figure 14** et **Tableau 4**. Elle a été conservée à basse température «  $t < 4^{\circ}\text{C}$  » dans des flacons hermétiques.

**Tableau 4:** Caractéristiques organoleptiques d'*O. Vulgare*.

<b>Aspect</b>	liquide
<b>Couleur</b>	Jaune
<b>Saveur</b>	Piquante Epissée
<b>Odeur</b>	Thymolé



**Figure 14:** L'HE obtenue par Hydro-distillation.

### III.3. Composition chimique de l'HE

Les différents constituants des huiles essentielles ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des composés de base de données Adams [9]. L'identification des molécules a été confirmée par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux connus dans la littérature [51].

Les indices de rétention des composés ont été calculés grâce aux temps de rétention d'une série n-alcanes avec une interpolation linéaire. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 15** et **Tableau 5**.

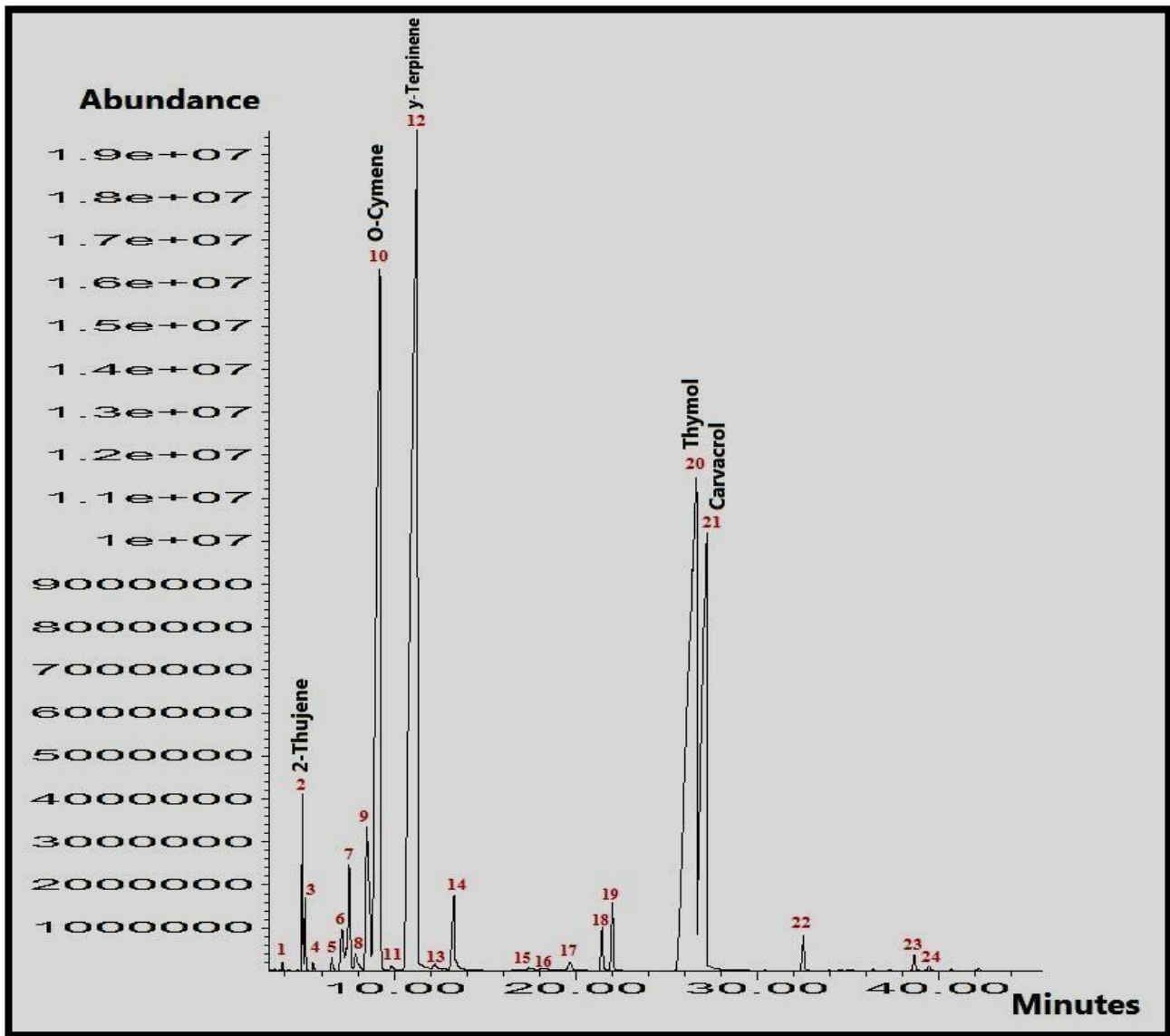


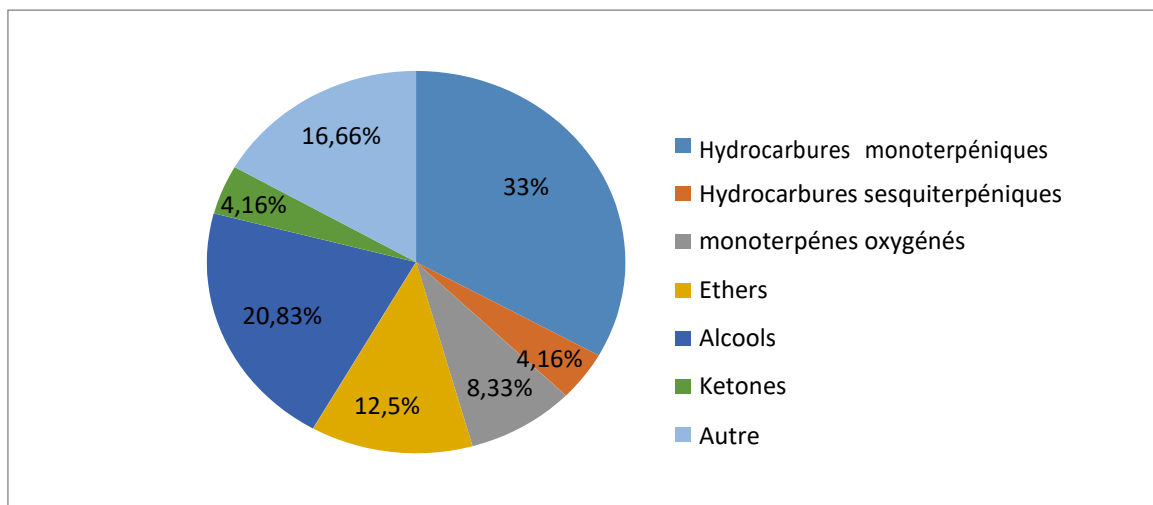
Figure 15 : Chromatogramme de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.

## Chapitre III : Résultats et discussion

**Tableau 5:** Composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.

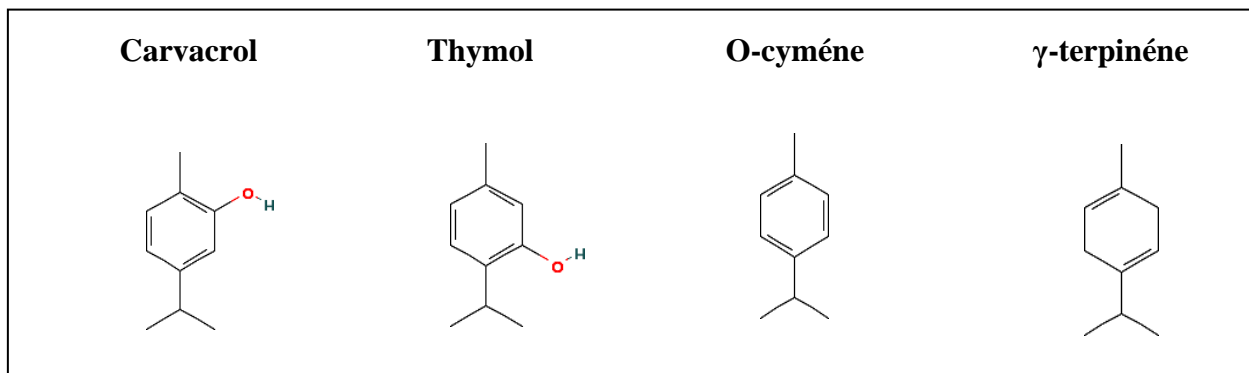
N° du pic	TR (min)	IR	IR <sub>réf</sub>	Nom de composés volatils
1	3.89	887	892	3-heptanone
2	4.90	966	930	2-thujene
3	5.46	956	-	Dehydrosabinene
4	5.85	937	939	à-pinene
5	6.61	-	979	B-pinene
6	6.91	974	975	Sabinene
7	7.04	980	689	amyl venylcarbinol
8	7.43	988	990	Myrcene
9	8.33	1017	1017	α- Terpinene
10	9.053	1022	1026	O-Cymene
11	9.27	1317	-	B-terpineol,acetate
12	11.28	1054	1059	γ-Terpinene
13	13.15	1099	1096	Linalool
14	13.94	1140	1144	cis-β-Terpineol
15	16.31	-	-	6,9, 12-Octadecatrienoic acid, methyl ester
16	17.61	1241	1244	Carvacrol, methyl ether
17	17.89	1177	1017	Terpinen-4-ol
18	19.61	1189	1888	Terpineol<α->
19	21.19	1235	1235	Thymol, methyl ether
20	26.42	1291	1290	Thymol
21	27.01	1299	1299	carvacrol
22	32.24	-	-	Semicarbazide,1-(4-tert-butyl-phenoxy)-acetyl-4phenyl-3-thia
23	38.27	-	-	1H-2,8a-methanocyclopenta(a)cyclopropano(cyclodecen-11-one,1a,2,5,5a,6,9,10,10a-octahydro-5,5a,6-trihydroxy-1,4-bis(hydro)
24	39.00	1505	1505	β-Bisabolene

Nous avons pu identifier 24 composés représentés dans le tableau ci-dessus et on a ressorti 6 classes biochimiques fondamentales : hydrocarbures monoterpéniques (33%), monoterpènes oxygénés (8.33%), hydrocarbures sésquitérpéniques (4.16%), alcools (20.83%), éthers (12.5%), cétones (4.16%), et autres (restedes composés) (16.66%) sont représentés dans la **Figure 16**.



**Figure 16 :** Répartition des principales familles de composés de l'HE d'*O. Vulgare*.

Cependant, notre huile est caractérisée par la prédominance de quatre composants dite majeurs : à savoir le thymol et le carvacrol appartenant aux monoterpènes oxygénés ; le O-cymène et le  $\gamma$ -terpinène, parmi les hydrocarbures monoterpéniques représentés par la **Figure 17**.



**Figure 17 :** Quelques structures de substances majeures rencontrées dans les HES d'Origan [53].

La composition d'origan dépend du climat, de l'altitude, la période de cueillette et du stade de croissance. *L'O.vulgare* cultivé dans le climat méditerranéen ou continental contient une grande quantité de phénols ; ou des alcools terpéniques, respectivement [54]

## Chapitre III : Résultats et discussion

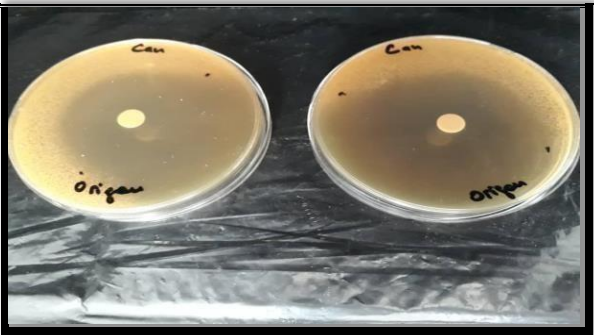
Les espèces du genre *Origanum* sont décrites dans différents travaux pour leur grand polymorphisme chimique. Ainsi, selon la composition chimique de leurs HEs rapporté par **Kokkini, (1996)**, les différentes espèces de ce genre sont réparties en trois groupes chimiques : Linalol, terpinène-4-ol, hydrate de sabinène; Carvacrol et/ou thymol et le groupe des sesquiterpènes. [56]

D'après les résultats obtenus, nôtre s'avère appartenir au groupe **thymol** car cette molécule est majoritaire dans l'HE. Nos résultats concordent avec plusieurs investigations qui dénotent la forte teneur de cette dernière.

### III.4. Effets de l'huile essentielle d'origan sur la croissance de la souche fongique

Les résultats des tests antifongiques de l'huile essentielle d'*O.Vulgare* et celle de la CMI et CMF sont représentés par la **Figure 19** et les tableaux suivant **Tableau 9**, **Tableau 10** et **Tableau 11**.

**Tableau 6:** Diamètres d'halos d'inhibition en mm de la croissance de la souche fongique.

L'huile essentielle	Zone d'inhibition
	63Mm et 61Mm

**Tableau 7:** Détermination de la CMI.

Concentration HEs	0,25	0,125	0,06	0,03	0,0015	0,00075
Culture fongique	-	-	-	+	+	+

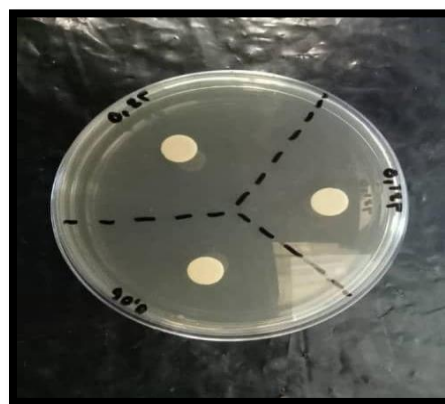


## Chapitre III : Résultats et discussion

---

**Tableau 8:** Détermination de la CMF.

<b>Concentration d'HE</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,06</b>
<b>Culture fongique</b>	-	+	+



**Figure 18 :** Détermination de la CMF.

Les résultats obtenus concernant l'effet inhibiteur d'huile essentielle de l'origan comparé à celui des antifongiques classiques, ont montré que cette plante présente un bon effet antifongique sur la souche *Candida albicans* testée. Les diamètres d'inhibition trouvés ont été de 60mm à 63 mm. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par **A.Pameiro-de-oliveira (2009) [59]**, qui ont confirmé l'effet des huiles essentielles sur la croissance de *Candida albicans*.

Les résultats émanant des tests de l'activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* par la méthode de diffusion sur disques ont montré que l'extrait organique d'origan possède une activité inhibitrice vis-à-vis de la levure testée, la CMI et la CMF vis-à-vis de *Candida albicans* est de 0,06 µg/ml et 0,25 µg/ml respectivement.

Les résultats des tests d'inhibition de *Candida albicans* montrent que notre extrait de l'HE est doué d'une forte activité antifongique [59].

L'équipe de **Khosravi [3]**, a démontré que ces huiles essentielles inhibent la croissance de 16 souches *Candida glabrata* à un volume de 20 µl et avec une CMI de 340,2 µg/ml

### III.5. Formulation

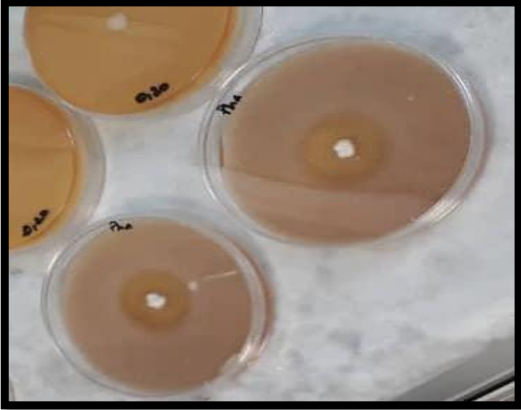
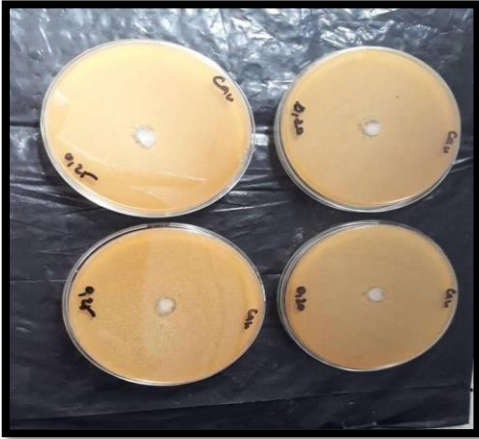
#### III.5.1. Diamètre des onguents

Le diamètre d'inhibition des trois pommades est représenté par le **Tableau 06**.

## Chapitre III : Résultats et discussion

---

**Tableau 9 :** Diamètre d'inhibition des pommades formulées.

Pommade testée	Diamètre d'inhibition
<p data-bbox="282 373 743 403"><b>Pommade de référence (Phanazol)</b></p> 	<p data-bbox="971 592 1065 621"><b>23MM</b></p>
<p data-bbox="224 932 805 961"><b>Pommade de concentration 0,25% ; 0,20%</b></p> 	<p data-bbox="889 1129 1146 1159"><b>2,3 MM &amp; 2,7 MM</b></p>

Le diamètre d'inhibition de phanazol est compris entre 23mm et celle de notre pommade était respectivement de 2, 3mm et 2,7mm. Ces résultats concordent avec celles menées par **Pozzatti et al (2010)** [57].

Sur l'activité antifongique de phanazol et celles obtenues dans notre étude sont légèrement proches de celle avancée par l'équipe de **Maarif et al (2014)** [51].

## Chapitre III : Résultats et discussion

### III.5.2. Test d'irritation cutanée

L'effet irritant sur la peau des lapins (**OCDE 404**) [58] a été étudié avec la pommade à une concentration égale au rendement : 0,34% ; contrairement aux deux autres concentrations 0.20% et 0.25% où l'application des pommades n'a présenté aucun érythème ou œdème comme démontré dans la **Figure 18** et **Tableau 7**.



**Figure 19:** Résultat respectifs des tests d'irritations cutanées des trois pommades à 0.34% 0.25% ; 0.20%

**Tableau 10:** Test d'irritation des trois doses de pommade formulée

Timbres / Temps	30 mn	1 heure	4 heures	24 heures	48 heures	72 heures
Cotation des réactions cutanées 0,34%.						
<b>Timbre 1</b>	(a3) (b2)	(a3) (b2)				
<b>Timbre 2</b>	//	(a)				
<b>Timbre 3</b>	//	//				
Cotation des réactions cutanées 0,25%.						
<b>Timbre 1</b>	/	/	/	/	/	/
<b>Timbre 2</b>	/	/	/	/	/	/
<b>Timbre 3</b>	/	/	/	/	/	/
Cotation des réactions cutanées 0,20%.						

## Chapitre III : Résultats et discussion

Timbre 1	/	/	/	/	/	/
Timbre 2	/	/	/	/	/	/
Timbre 3	/	/	/	/	/	/

➤ Formation d'érythème et d'escarre : (a)

➤ Formation d'œdème : (b)

A la concentration 0,34%, le test d'irritation a conclu la formation d'érythèmes et d'escarres plus la formation d'œdème durant les 30mn suivant l'application de l'onguent du fait qu'elle était très dosée, de ce fait l'arrêt immédiat du test est obligatoire.

Celles de 0,25% et 0,20% n'ont fait l'objet d'aucun érythème ni escarre ni œdème durant les deux phases, ceci suggère donc que cette concentration ne provoque aucune inflammation contrairement à la première.

### III.6. Activité antifongique

#### III.6.1. Culture fongique

Trois grattages ont été effectués sur tous les lots infectés durant toute l'expérimentation pour l'examen microbiologique, les résultats sont représentés dans le **Tableau 8** ci-dessous :

**Tableau 11:** Résultat de la culture fongique moyenne.

	1 <sup>er</sup> grattage (2 <sup>ème</sup> jours d'induction)	2 <sup>ème</sup> grattage (5 jours de traitement)	3 <sup>ème</sup> grattage (Fin d'expérimentation)
T <sup>+</sup>	145	226	96
R	148	176	21
E1	114	300	25
E2	68	240	23

## Chapitre III : Résultats et discussion

---

Les résultats obtenus de la culture fongique après le 1<sup>er</sup> grattage sur tous les lots ont révélé une charge fongique importante après 48h d'incubation ce qui confirme la présence de candidose cutanée sur ces derniers.

Après un 2<sup>ème</sup> grattage au 5<sup>ème</sup> jour de traitement, nous avons observé une augmentation de la charge fongique sur tous les lots car les différents traitements n'avaient toujours pas d'effet inhibiteurs sur l'infection fongique en raison de la charge excessivement importante de candidose lors de l'induction ceci s'explique aussi par la perte de deux rats suite à cette dernière.

A la fin du traitement un 3<sup>ème</sup> et dernier grattage est effectuée pour confirmer l'efficacité des onguents, en effet, la diminution de la charge fongique a été observée sur tous les lots mais a été moins significative dans le lot témoin positif n'ayant reçu aucun traitement par rapport aux autres.

On observe également que les trois lots ayant reçu les onguents présentent une très grande similarité de charge fongique à la fin du traitement, ce qui conclut donc que la pommade à base d'HE d'*O.vulgare* possède la même efficacité que celle de référence contre la candidose.

### III.7. Evaluation clinique

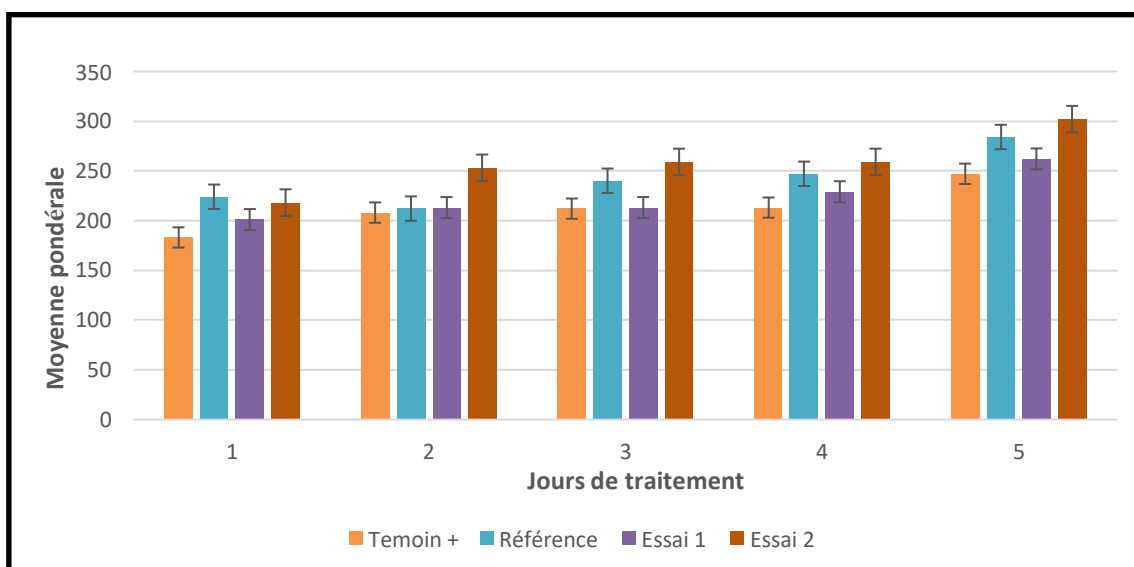
Le suivi des rats a nécessité une pesée quotidienne du poids corporel, et une prise de température durant toute la période d'expérimentation depuis l'induction de candidose jusqu'à la fin de l'expérimentation (n= 16 jours), les résultats sont illustrés dans les **Tableau 12** et **Tableau 13** et par les **Figure 20** et **Figure 21** ci-dessous :

#### III.7.1. Evaluation pondérale des lots

**Tableau 12:** Evaluation de la moyenne des poids des lots

M. lot /jours	J <sub>0</sub>	J <sub>5</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>12</sub>	J <sub>16</sub>
<b>T<sup>+</sup></b>	183±20	208±20	212±20	213±20	247±20
<b>R</b>	224±20	212±20	240±20	247±20	284±20
<b>E1</b>	201±20	213±20	213±20	229±20	262±20
<b>E2</b>	218±20	253±20	259±20	259±20	302±20

**T<sup>+</sup>**: Témoin positif, **R**: référence, **E1** : Essai 1, **E2** : Essai 2 n=5



**Figure 20 :** Evaluation de la moyenne des poids des lots en fonction des jours de traitement.

L'analyse statistique de l'évaluation moyenne des poids à montrer que les poids diminuent pour tous les lots durant les premiers jours suivant l'immunodépression et l'induction de la candidose, puis avec le début des différents traitements, tous les lots commencent à avoir une évolution pondérale modérée ( $p < 0,05$ ) excepté le lot témoin positif n'ayant reçu aucun traitement avec des poids compris entre 180 et  $250 \pm 50$ g et amélioration non significative ( $p > 0,05$ ), ce qui suggère que les différents onguents sont efficaces néanmoins, on observe aussi que le lot ayant reçu le dosage 0,25% a eu une plus grande évolution pondérale comparé aux autres ( $p < 0,001$ ).

### III.7.2. Evaluation de la température des lots

**Tableau 13:** Evaluation de la température moyenne des lots.

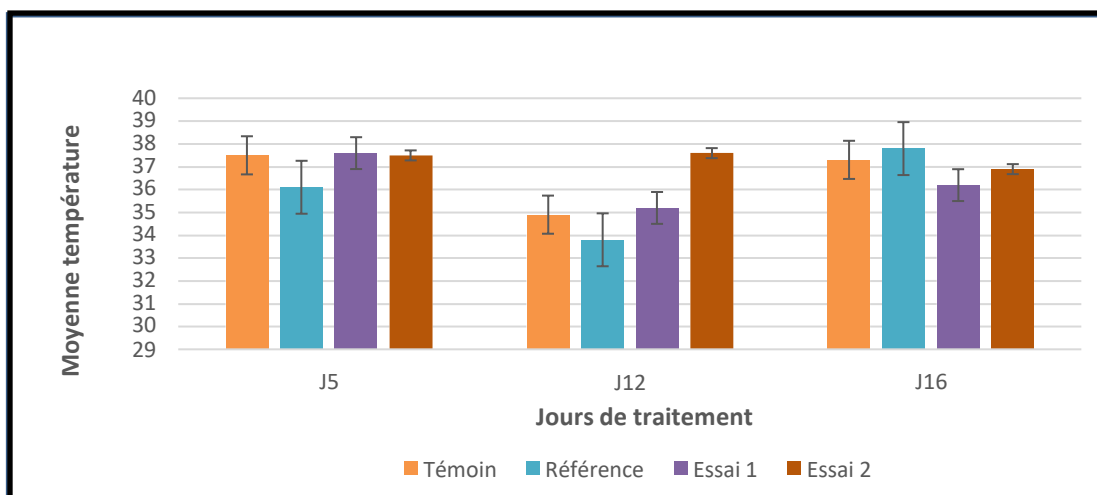
lot/ jours	J <sub>5</sub>	J <sub>12</sub>	J <sub>16</sub>
<b>T<sup>+</sup></b>	37,5±2	34,9±2	37,3±2
<b>R</b>	36,1±3	33,8±3	37,8±3
<b>E1</b>	37,6±1	35,2±1	36,2±1
<b>E2</b>	37,5±0,5	37,6±0,5	36,9±0,5

**T<sup>+</sup>**: Témoin positif, **R**: référence, **E1** : Essai 1, **E2** : Essai 2 n=3

## Chapitre III : Résultats et discussion

---

- De 37 à 35 °C : normo-thermie.
- De 35 à 32 °C : hypothermie légère.
- De 32 à 28 °C : hypothermie modérée.
- Moins de 28° C : hypothermie sévère.



**Figure 21 :** Evaluation de la température moyenne des lots en fonction des jours de traitement.

Pour l'évaluation de température moyenne de chaque lot, l'analyse statistique à montrer que le lot T+ n'ayant reçu aucun traitement était en normo-thermie après l'immunodépression et l'induction de la candidose, après ces dernières la température moyenne évolue vers une hyperthermie, ce qui conclut que la candidose cutanée persiste toujours.

Pour les autres lots ayant reçu différents traitements et doses, la température évolue dans le cadre de la normo-thermie avec des températures de  $36\pm 1$  et  $38\pm 1$  pour les trois lots de façon très similaire ( $p < 0,05$ ), ce qui concorde donc avec le fait que les deux doses formulées 0,20% et 0,25% possèdent la même efficacité contre l'infection que celle du médicament référence (phanazol).

### III.7.3. Evaluation de l'état général de tous les lots d'animaux immunodéprimés

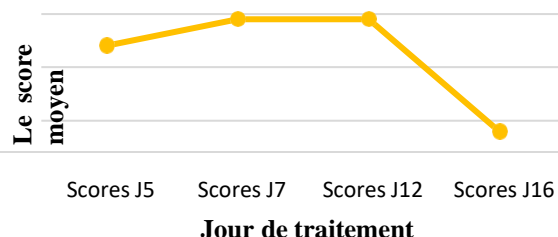
Durant toute l'expérimentation par grille des scores la moyenne de : l'apparence, le comportement naturel, l'hydratation et les signes cliniques ont été étudiés sur chaque lots.

### Chapitre III : Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 14,15, 16 et 17**) et illustré par les figures suivantes (**Figure 22,23 ,24 et 25**) qui indiquent leurs évolutions.

**Tableau 14 :** Evaluation de l'état général du lot Témoins positif

Rats/ jours	Scores J5	Scores J7	Scores J12	Scores J16
Lot T+	4,8	5,8	5,8	1,6

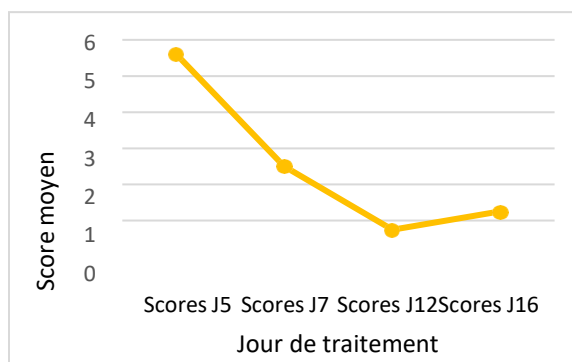


**Figure 22 :** Evaluation de l'état général du lot Témoin positif en fonction du traitement.

Au premier jour du traitement de la candidose, le score d'état général des rats était compris entre 3 et 5, après deux jours, les scores augmentent et sont compris entre 5 et 7, ce qui conclut à la présence de candidose cutanée. Après 5 jours sans traitement, le score diminue pour le lot mais de façon très médiocre pour être compris à 1.6, ce qui conclut que la candidose persiste et que les rats de ce lot n'ont pas totalement guéris de la candidose.

**Tableau 15:** Evaluation de l'état général du lot Référence

Rats/ jours	Scores J5	Scores J7	Scores J12	Scores J16
Lot Référence	5,6	2,5	0,75	1,25



**Figure 23 :** Evaluation de l'état général du lot Référence en fonction du traitement.

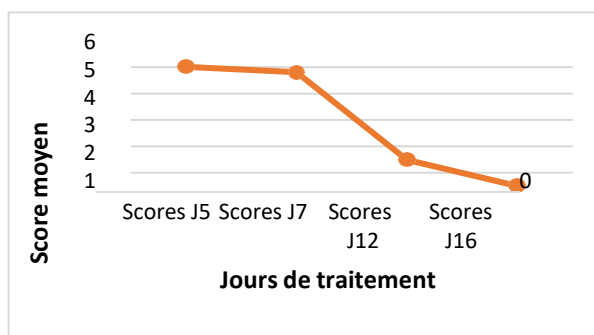


## Chapitre III : Résultats et discussion

Le score d'état général de ce lot durant les premiers jours de l'induction de la candidose est compris entre 5 et 6 mais après le traitement, le score commence à diminuer entre les jours 3 et 7 pour être compris entre 1 et 2 à la fin du traitement, ce qui indique que le phanazol est un médicament très efficace contre la candidose cutanée et que l'infection fongique a quasiment disparue après 7 jours du traitement.

**Tableau 16 :** Evaluation de l'Etat général du lot Essai1 0.20%

Rats / jours	Scores J5	Scores J7	Scores J12	Scores J16
Lot E1	5	4,8	1,5	0,5

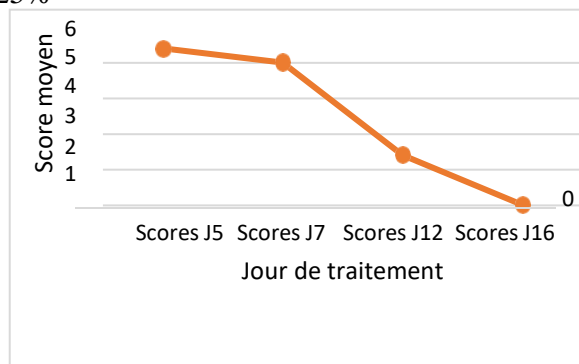


**Figure 24 :** Evaluation de l'état général du lot Essai 1 en fonction du traitement.

Le score d'états général au début du traitement est compris entre 5 et 6 pour le lot ayant reçu le dosage de 0,20%, et diminue petit à petit durant les 11 jours de traitement pour être compris entre 0 et 1 à la fin du traitement, ce qui nous renseigne sur l'efficacité de notre pommade à 0.20% et son effet sur la candidose et donc représente un bon traitement contre les infections fongiques à *Candida albicans*.

**Tableau 17 :** Evaluation de l'Etat général du lot Essai 2 : 0.25%

Rats / Jours	Scores J5	Scores J7	Scores J12	Scores J16
Lot E2	5,4	5	2,4	1



**Figure 25:** Evaluation de l'état général du lot Essai 2 en fonction du traitement.

## Chapitre III : Résultats et discussion

---

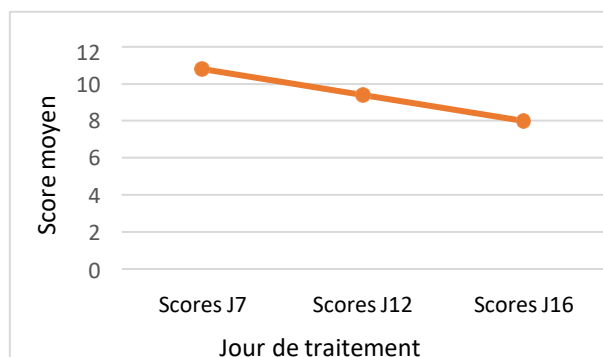
Le score d'état général du lot ayant reçu le dosage 0.25% est compris entre 5 et 6 durant les premiers jours d'induction de la candidose et après les deux premiers jours de traitement, le score commence déjà à diminuer pour être compris entre 4 et 5 puis atteindre 1 durant les derniers jours du traitement, ce qui conclut que la deuxième dose de 0,25% de pommade a un effet antifongique sur la candidose cutanée et donc sur l'infection fongique.

### III.7.4. Scores d'évaluation clinique (macroscopique) de tous les lots d'animaux immunodéprimés

Durant toute la période d'expérimentation sur la zone cutanée infectée, les paramètres suivants sont étudiés : Erythème, tuméfaction, desquamation, pustules et éruption rouge vif de chaque lot des rats, les résultats sont ainsi représentés dans les tableaux suivants (**Tableau 18, 19,20 et 21**) ci-dessous et illustrées par les figures suivantes (**Figure 26, 27, 28, 29**).

**Tableau 18:** Evaluation de l'Etat général du lot Témoins positif

Rats/Jours	Scores J7	Scores J12	Scores J16
Lot T+	10,8	9,4	8

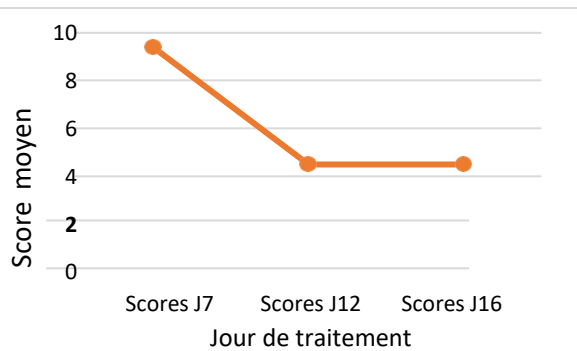


**Figure 26 :** Evaluation de l'état macroscopique du lot témoins positif en fonction du traitement.

## Chapitre III : Résultats et discussion

**Tableau 19:** Evaluation de l'état général du lot Référence

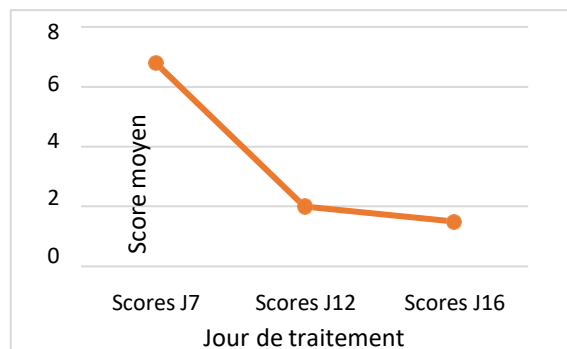
Rats/ Jours	Scores J7	Scores J12	Scores J16
Lot Référence	9,4	4,5	4,5



**Figure 27 :** Evaluation de l'état macroscopique du lot Référence en fonction du traitement.

**Tableau 20:** Evaluation de l'état général du lot Essai 1 (0.20%)

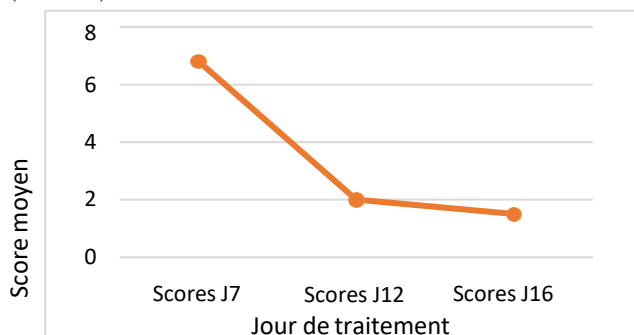
Rats /Jours	ScoresJ7	ScoresJ12	ScoresJ16
Lot E1	6,8	2	1,5



**Figure 28 :** Evaluation de l'état macroscopique du lot Essai 1 en fonction du traitement.

**Tableau 21:** Evaluation de l'état général du lot Essai 2 (0.25%)

Rats / Jours	Scores J7	Scores J12	Scores J16
Lot E2	9,2	3	0,8



**Figure 29 :** Evaluation de l'état macroscopique du lot Essai 2 en fonction du traitement.

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

---

Nous avons évalué les scores d'évaluation clinique des lots durant toute l'étude afin de noter tous changements macroscopiques sur la peau des rats infectés. Nous avons observé durant les 48h suivant l'induction de la candidose que tous les rats ont manifesté des éruptions cutanées avec érythèmes, œdème et desquamations.

Pour le lot n'ayant reçu aucun traitement (Témoins +), nous avons noté que les scores moyens d'évaluation clinique sont comprises entre (8 et 10) durant toute l'étude, on conclut ainsi que la candidose est persistante sur ce lot, contrairement aux autres lots.

En effet, les lots ayant reçu le dosage (0,20%) et (0,25%) présentent une très grande similitude de scores après 12 jours de traitement compris entre 0 et 2.

Nous avons également observé que la moyenne d'érythèmes et d'œdèmes dans ces deux lots ont diminué de façons bien plus significatives que celle du lot référence, qui lui représentent une diminution légère comprise entre 4 et 5.

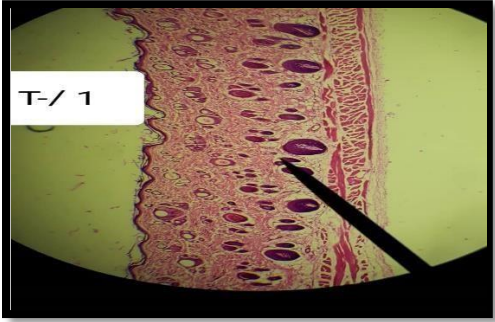

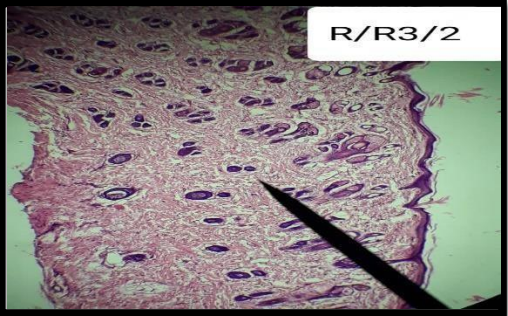
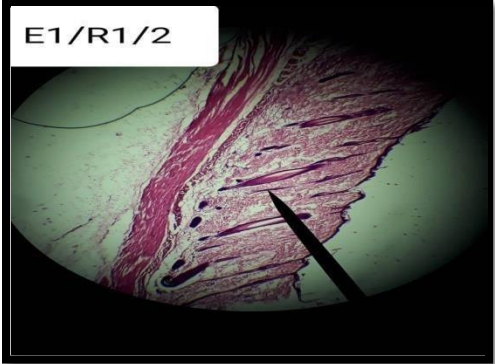
Dans les deux lots références et essai 2 à (25%), deux rats sont décédés avant la fin de l'expérimentation du fait qu'ils présentaient des scores cliniques très élevés dû à l'immunodépression et à la surcharge de candidose sur la zone infectée.

### **III.8. Etude Histo-pathologique des lambeaux cutanés**

L'étude histo-pathologique réalisée, les résultats de l'examen microscopique des lambeaux cutanés prélevés de chaque rat des différents lots sont représentés dans le **Tableau 22**.

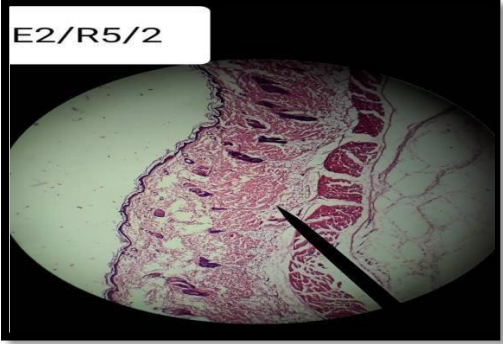
## Chapitre III : Résultats et discussion

**Tableau 22** : Illustration des résultats histopathologiques des lambeaux cutanés des différents rats de chaque lot et leur observation.

lames	Résultat microscopique	Observation
<p><b>Témoins (-)</b> <b>Rats *</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aucun œdème</li> <li>• Aucun décollement dermique</li> <li>• Aucune inflammation</li> <li>• Aucun pustule ou érythème</li> </ul>
<p><b>Témoins (+)</b> <b>R4</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Œdème de stade 3</li> <li>• Décollement dermique important</li> <li>• Inflammation sévère</li> <li>• Présence de pustule et érythème</li> </ul>
<p><b>Référence</b> <b>R3</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Œdème de stade 1</li> <li>• Décollement dermique modérée</li> <li>• Inflammation faible</li> <li>• Absence de pustule et érythème</li> </ul>
<p><b>Essai 1 Rats</b> <b>R1</b></p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Œdème de stade 2</li> <li>• Décollement dermique modérée</li> <li>• Inflammation faible</li> <li>• Présence de pustule et érythème</li> </ul>

## Chapitre III : Résultats et discussion

---

<p><b>Essai 2 Rats R5</b></p>		<ul style="list-style-type: none"><li>• Œdème de stade 1</li><li>• Décollement dermique faible</li><li>• Absence d'inflammation</li><li>• Absence de pustule et érythème</li></ul>
-----------------------------------	---	--

On observe sur toutes les lames un revêtement malpighien kiotique d'épaisseur variable et la présence de follicules pilosébacés et chorion fibreux.

L'œdème a été observé sur la totalité des rats, ce qui prouve la présence d'infection cutanée due à la candidose sauf chez les témoins négatifs ayant eu aucune candidose, néanmoins nous avons aussi observé qu'il était moins accentué sur les lambeaux cutanés des rats des lots ayant reçu le médicament référence (Phanazol) et celui avec la pommade dosée à (0,25%).

En dernier lieu, nous avons observé des peaux sensiblement normales et guéries sur les mêmes lots, ce qui suggère que notre pommade au dosage (0,25%) possède la même efficacité que celle du médicament référence qui est le phanazol et ceci est confirmé par les résultats microscopiques.

# *Conclusion*

---

## Conclusion

### Conclusion

Cette étude a été menée sur l'huile essentielle d'origan (*Origanum vulgare*) et a donné des résultats encourageants. Elle concerne la valorisation des substances naturelles comme alternatives aux médicaments synthétiques de l'industrie pharmaceutique.

En premier lieu, nous avons passé en revue la synthèse des travaux bibliographiques du genre *Origanum vulgare* sur plusieurs aspects à savoir la taxonomie et la distribution de celle-ci ; En deuxième lieu nous nous sommes intéressés à son huile essentielle à son extraction, et en rendement. L'étude de sa composition chimique par CPG-MS a révélé quatre classes importantes : Hydrocarbures monoterpéniques, monoterpènes oxygénés, alcools, et éthers.

Après la formulation, les résultats enregistrés montrent que les deux pommades à base d'huile essentielle d'origan présentent des propriétés antifongiques prometteuses (in vivo et in vitro). En effet, avec la concentration (0.25%), une inhibition totale de la croissance mycélienne pour la souche candida testée a été observée.

Notre travail montre que la flore Algérienne peut constituer une réserve importante d'espèces végétales intéressantes, dont les principes actifs peuvent être employés dans plusieurs domaines. D'après ces résultats, on peut penser que les huiles essentielles de cette espèce méritent une étude plus approfondie pour exploiter leurs propriétés biologiques de manière plus approfondie et avec des appareils plus sophistiqués à l'échelle industrielle.



*Références  
Bibliographiques*

---

## Références bibliographiques

---

### Référence :

1. Bouziane Z. Contribution à l'étude ethnobotanique des plantes médicinales de la région d'Azail (Tlemcen –Algérie), [Mémoire], Université ABOUBAKR BELKAID, faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers ; 2016/2017.
  2. Eline P. Phytothérapie – exemples de pathologies courantes à l'officine : fatigue, insomnie, stress, constipation, rhume, douleur et inflammation [Thèse]. France : université de Lille, faculté de pharmacie ;2018/2019.
  3. Hamadi F, Boudif K, Gougam K, Djouab A, Allane T, Benmounah T, Benamara S. Caractérisation d'une préparation semi-solide traditionnelle anti-brûlure ; [consulté le 15 mars 2020]. Disponible sur : <http://www.academia.edu>; 2014.
  4. Hamel T, Sadou S, Seridi R, Boukhdir S, Boulemtafes A. Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'Edough (nord-est algérien). Algérie : Université Badji Mokhtar Annaba.
  5. Salzer U.J. L'analyse des huiles essentielles et des extraits (oléorésines) de l'assaisonnement, une revue critique. Crit. Rev Food Sci. Nutr. 9 : 345-373 ; 1977.
  6. Nora Mahfouf. Étude de l'espèce *Origanum vulgare L.* Botanique. Université Chadli Benjedid - El Tarf (Algérie) [Thèse], 2018. Français
  7. Kntzios S. Oregano: The general Origanum and Lippia (Medicinal and Aromatic Plants –Industrial Profiles). Taylor et Francis suction de toxins d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. 14-19p; 2002.
  8. Tang W. and Eisenbrand G. Chinese drugs of plant origin. Chemistry, pharmacology and use in traditional and modern medicine. 1<sup>er</sup> éd. Kaiserslautern, Berlin: Springer–Verlag ; (1992).
  9. Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography /massspectrometry, Allured Publishing Corporation; (2007).
  10. Dubois J, Mitterand H, Dauzat A. Dictionnaire étymologique et historique du français, Éditions Larousse ; 2006.
  11. Longevialle P. Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris, 1981.
  12. Boullard A. Plantes médicinales du monde ; 2001
  13. Lemhadri et al. Thèse de doctorat, 2004
  14. Lihsi W, Hedge I. Lamiaceae. Flora of China. 17. 50–299 P; (1994).
-

## Références bibliographiques

---

15. Gurchan S. Plants Systematics: an integrated approach. USA: Science Publisher INC, infield. NH (Printed in India). Disponible online sur [http://books.google.fr] 15 p ; 2004.
  16. Quezel P, Santa S. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS (Ed) Paris. Tome 2 16p ; (1963).
  17. Bekhechi Chahrazed. Analyse (les huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par (CPG, CPG-SM et RMN 13 C) et étude de leur pouvoir antibactérien). Thèse ; Université Abou Bakr Belkaïd, Faculté des Sciences, Tlemcen. Algérie (2009).
  18. Bouhaddouda, Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *Origanum vulgare* et *Menthapulegium* université Badji moktar, Annaba. (2016).
  19. Benjilali B. Etude de trois plantes aromatiques et médicinales du Maroc: armoises, thym et origan. Chimie de leurs huiles essentielles, chimiotaxonomie et propriétés antimicrobiennes. Sciences Agronomiques IAV Hassan II. Rabat, Maroc ; (1986).
  20. Deysson, G., Eléments d'anatomie des plantes vasculaires. Société d'Édition d'Enseignement Supérieur (SEDES), Paris, 266p ; (1965).
  21. Lis-Balchin M. Lavande : le genre *Lavandula*. Taylor et François. Londres 257p ; 2002.
  22. Jacques G. et Paltz S. Le fascinant pouvoir des huiles essentielles. In : Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium* *phle* et *Mycobacterium fortuitum*. Faculté "Jacque Paltz" ; (1997).
  23. Hamel T, Sadou S, et all. Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'Edough (nord-est algérien). Algérie : Université Badji Mokhtar, Annaba.
  24. Crespo M E, Jiménez J, Navarro C. Special methods for the essential oils of the genus *Thymus*. In: Modern Methods of Plant Analysis, edited by H.F. Linskens and J.F. 41-61 p; 1991.
  25. Goetz Paul. Phytothérapie en odontologie - Editions CdP. ISBN 978-2-84361-244-2 ; 2014.
  26. Boukhobza Fet Goetz P. Phytothérapie en odontologie - Editions CdP. ISBN978-2-84361-244-2014.
  27. Lucchesi M, Chemat F, Smadja J. Extraction sans solvant par micro-ondes d'huiles essentielles d'herbes aromatiques : comparaison avec l'hydro-distillation conventionnelle. J. Chromatographie. 1043(2). 323-327P ; 2005.
  28. Brian M L. L'isolement des matières aromatiques des produits végétaux, R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston-Salem (États-Unis). 57-148p, 1995.
  29. Baudoux, D., Blanchard, JM., Malotau, AF. Les cahiers pratiques d'aromathérapie selon l'école française. Inspir S.A, 2006.
  30. Burt S., Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in Foods. A
-

## Références bibliographiques

---

review intern : J. Food. Microbiol. 94: 223-253. 2004.

31. Bruneton J. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec&Doc. Paris.

32. Olle M .et Bender I., The content of oil in umbelliferous crops and its formation Agronomy research 8(3).PP687-696, 2010.

33. Khosravi, AR., Shokri, H., Kermani, S., Dakhili, M., Madani, M., Parsa, S. Antifungal properties of Artemisia sieberi and Origanum vulgare essential oils against Candida glabrata isolates obtained from patients with vulvo vaginal candidiasis. J. Mycol. Med., 21: 93-99, (2011)

34. Silva, C., Guterres, S., Weisheimer, V. and Schapoval, E. Antifungal activity of the lemon grass oil and citral against Candida spp. Braz. Infect. Dis., 12(1), pp. 63-66, (2008).

35. Isman. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection 19.p.9, (2000).

36. Edris A E., Shalaby A S., Fadel H M et Abdel-Wahab M A. Evaluation of a chemotype of spearmint (Menthaspicata L.) grown in Siwa Oasis, Egypt. Europe an Food Research and Technology. 218(1). 74-78 P(Edris, 2003).

37. Davidson P M., Sofos J N ET Branen A L. Antimicrobials in Food (éd. Third Edition). Boca Raton: CRC Press. 429 p, 2005.

38. Eline pasdloup grenez. Phytothérapie : exemples de pathologies courantes à l'officine ; [Thèse].Université de Lille, faculté de pharmacie ; 2018/2019

39. F. Hamadi1, K. Boudifl, H. et al. Caractérisation d'une préparation semi-solide traditionnelle anti-brûlure ; 2014 ; <http://www.academia.edu>.

40. Daoudi-Merbah, F. et Dahmani-Megrerouche, M. Contribution à la caractérisation de la niche écologique d'espèce menacée : Elément pour sa conservation et sa valorisation. Université USTH International Congress of the Populations & Animal Communities "Dynamics & Biodiversity of the terrestrial & aquatic Ecosystems (Bechar) – ALGERIA, (2013).

41. Rasooli. I; Abyaneh M.R., Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by aspergillus parasiticus. Food control 15, 2004.

42. Wichtl M. et Anton R., Les plantes thérapeutiques. Tradition, pratiques officinales, sciences et thérapeutiques. Ed TEC et DOC. Lavoisier, (2003).

43. Svoboda, K. P. and Hampson, J. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. . (1999). <http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars>

44. Woussi djewed. Formes galéniques administrées par voie cutanée. In : pharmacie galénique : Formes galéniques administrées par voie cutanée. Université Joseph Fourier de Grenoble ; 2010/2011)

---

## Références bibliographiques

---

45. CHENIH Manal – HAOUACHE Loubna ; Etude phytochimique d'une plante médicinale et quelques formes galéniques d'utilisation en phytothérapie ; Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Master Académique en Chimie pharmaceutique, (2020).
46. Fenn, J. P., H. Segal, L. Blevins, S. Fawson, P. Newcomb-Gayman, and K. C. Carroll. « Comparison of the Murex Candida albicans CA 50 test with germ tube production for identification of C.albicans». *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 24:31–35. 1996.
47. Fadil, M., Farah A., Ihssane, B., Haloui, T., Rachid, S. *Int. J. Innov. Appl. Stud.*, 8372. (47),(2014).
48. Buchanan B., Gruissem W., Jones R., 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Eds. American Society of Plant Physiologists, p. 1253-1258, 1304-1308, 1999.
49. Derwich, E., Benzyane, Z., Mnar, A., Boukir, A., Taouil, R. Phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* from Morocco. *American EUR asian Journal of Scientific Research* .5(2), 120-129. (2010).
50. Veres, K., Varga, E., Dobos, A., Hajdu, Zs.Mathe, I., Nemeth, E., Szabo. Investigation of the composition and stability of the essential oils of *Origanum vulgare* ssp., *vulgare* L., and *O.vulgare* ssp.Hitus (Link) Ietswaart. *Chromatographia*. 57 (12), 95-98, (2003).
51. K Maarif, M. Bouchrik, B. Elmimouni, Y. Bensouda Extraction, activité antifogique et approche galénique de cinq huiles essentielles. *Phytothérapie. Nature et santé. Official n°82* (2016)
52. Oka Y, Nacar S, Putievsky E, Ravid U, Yaniv Z, Spiegel Y. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*; 90:710–715. (799+9), (2000).
53. Ocaña-Fuentes, A.; Arranz-Gutiérrez, E.; Señorans, F.J.; Reglero, G. Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine THP-1 macrophages. *Food Chem. Toxicol*, 48, 1568–1575, (2010).
54. Arcila-Lozano, C. Loarca-Pina, G., Lecona-Urbe, S., Gonzalez de Mejia, E., and Oregano:propieda des, composicion y actividad biologica. *Archivos Latino americanos de Nutricion*.54, 100–111, (2004).
55. Arnold, N., Bellomaria, B., Valentini, G. Composition of the essential oil of three different species of *Origanum* in the eastern Mediterranean. *Journal of Essential OilResearch*. 12, 192–196, (2000).
56. Kokkini, S. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. *Proceeding of the IPGRI International Work shop on Oregano*. 8-12 May 1996.
57. P. Pozzatti, É.S. Loreto, D.A. Nunes Mario, L. Rossato, J.M. Santurio, S.H. Alves. Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation *Journal de mycologie médicale* 20, 185-189, (2010).
-

## Références bibliographiques

---

58. Rex, J.H., Rinaldi, M.G. and Pfaller, M.A. « Resistance of Candida species to Fluconazole». Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1–8, (1995).
59. A.Pameiro-de-oliveira, L.Salgueiro, R. Palmeiro-de-Oliveira, J.Martinezde-oliveira, C.Pina- Vaz, J.A.Queiroz and A.G.Rodrigues. « Anti-Candida Activity of Essential Oils ». Mini-reviews in Medicinal chemistry, 1292- 1305, (2009).
60. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS; 404 Adopted: 28 July (2015).
61. Akrou, A., Chemli, R., Chreif, I., Hammami, M. Analysis of the essential oil of Artemisia campestris L. Flavour and Fragrance Journal 16: 337-339, (2001).
62. Jérôme Goust et Fabien Seignobos, *Basilic, Marjolaine et Origan*, Arles, Actes Sud, 91 p,(1999).
63. LETSWAART J.H. A taxonomic revision of the genus Origanum (Labiatae),leiden Botanical series 4Leiden university press: Le Hague.153 p, (1980)
-

# Annexe

## Annexe

### I. Présentation géographique du genre *Origanum*

#### Dans le monde

Les espèces du genre *Origanum* sont largement répandues dans les régions euro-sibériennes et irano-sibériennes.

Elles sont principalement distribuées autour du bassin méditerranéen, dont la majorité est présente dans l'Est méditerranéen, Europe, Asie et Nord Afrique

Nous pouvons citer :

- *O. vulgare* (*Origan commun*, ou *Marjolaine sauvage*),
- *O. Compactum* (*Origan compact*), *O. majorana* (*marjolaine* ou *Origan des jardins*)
- *O. dictamnus*, *O. onites*
- *O. heracleoticum*
- *O. syriacum*

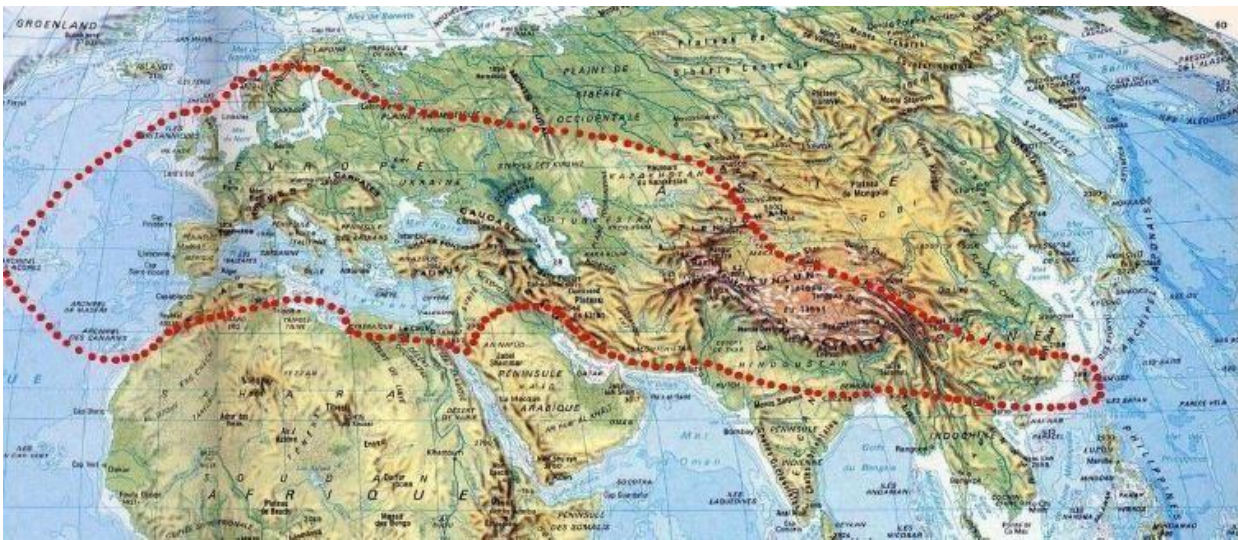


Figure 1 : Distribution du genre *Origanum* dans le monde.



## Annexe

---

### En Algérie

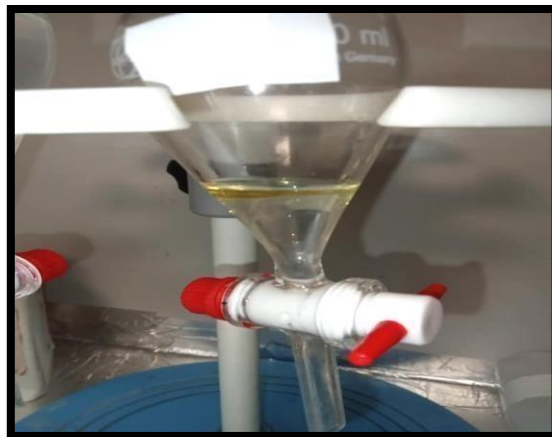
Le genre *Origanum* est représenté en Algérie, par trois espèces spontanées phylogénétiquement proches

- *Origanum majorana*
- *Origanum vulgare ssp glandulosum Desf*
- *Origanum floribundum*

### II. Figure :



**Figure 2 :** Appareil hydro distillation de type Clevenger (CRD Saidal biotic)

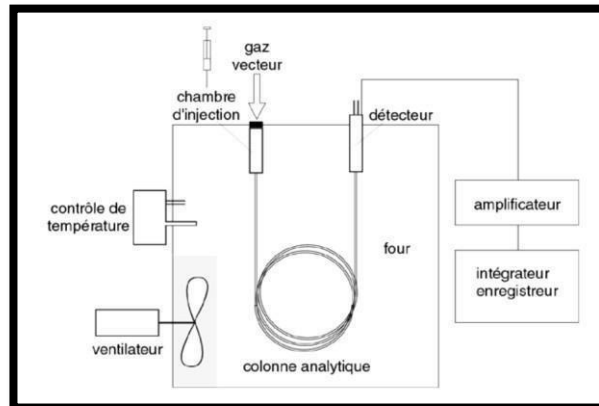


**Figure 3 :** Ampoule à décantation (CRD Saidal)



## Annexe

---



**Figure 4 :** Différents modules de la chromatographie en phase gazeuse.



**Figure 5 :** Appareil de la CPG / MS (CRD Sonatrach Boumerdès)



**Figure 6:** Injection de dexaméthasone

## Annexe

---



**Figure 7 :** Rasage de la dorsale des rats.



**Figure 8 :** Frottement à la pierre ponce et scarification.



**Figure 9 :** Induction de la candidose

## Annexe

---



**Figure 10 :** Application d'un pansement occlusif.



**Figure 11 :** Application du traitement.



**Figure 12 :** Evaluation pondérale des rats.

## Annexe

---



**Figure 13** : Prise de températures des rats.

## Résumé

---

### Résumé :

Notre travail s'inscrit donc dans le cadre de la découverte de nouveaux agents antifongiques naturels à partir de : (*Origanum vulgare*). Cette étude s'intéresse en premier à la détermination qualitative des différentes familles de métabolites secondaire des feuilles d'origan par la méthode dite "Chromatographie de phase gazeuse " couplée à la spectroscopie de masse.

On a évalué également l'activité antifongique de cet extrait vis-à-vis de *Candida albicans* in vivo et in vitro, l'huile essentielle a été extraite du matériel végétal par hydro-distillation. Ainsi, l'évaluation de l'activité antifongique de l'extrait été accompli après la formulation de deux pommades "Phanazol".à des dosages respectifs 0.20% et 0.25% en comparaison avec une pommade référence l'extrait d'*Origanum vulgare* possède une activité antifongique avec des diamètres des zones d'inhibition allant jusqu'à 63 mm.

En outre, Les résultats de l'activité in vitro ont montré une diminution de la charge fongique avec les 3 pommades avec une légère diminution plus significative de la pommade, Concernant les résultats in vivo, on a observé que les rats ayant reçu le traitement avec le dosage de 0,25% ont été guéris de façon plus rapide que l'autre ayant reçu le dosage 0,20% et le médicament référence (phanazol).

Pour confirmer davantage ces résultats, une étude histo-pathologique des lambeaux cutanés des rats a été faite, les résultats de cette étude ont démontré que notre pommade au dosage 0,25% possède la même efficacité que celle du médicament référence

### **Abstract:**

for 25 years synthetic drugs have not been able to prove their therapeutic effectiveness given the many sideeffects, our work is therefore part of the discovery of new natural antifungal agents from: oregano (*Origanum vulgare*).This study is primarily interested in the qualitative determination of the different families of secondary metabolites of oregano leaves by the method called "gas phase chromatography" coupled with mass spectroscopy, we will also evaluate the antifungal activity of this extract against -à-vis *Candida albicans* in vivo and in vitro, the essential oil was extracted from the plant material by hydro-distillation. Thus, the evaluation of the antifungal activity of the extract was accomplished after the formulation of two ointments at respective dosages of 0.20% and 0.25% in comparison with a reference "phanazole"

It results from this activity that the extract of *Origanum vulgare* has an antifungal activity with diameters of the zones of inhibition ranging up to 63 mm.

In addition, The results of fungal activity in vitro showed a decrease in fungal load with the 3 ointments with a slight more significant decrease in the ointment, Regarding the results in vivo, it was observed that rats given the treatment with the 0.25% dosage were cured more quickly than the other who received the 0.20% dosage and the reference drug (phanazol).

To further confirm these results, a histo-pathological study of the skin flaps of rats was carried out, the results of this study showed that our ointment at the 0.25% dosage has the same effectiveness as that of the reference drug.