

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة - الحراش - الجزائر

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EI-HARRACH –ALGER

## Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Sciences agronomiques

**Option : Sciences alimentaires**

### THEME

Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles et extraits du romarin (*Rosmarinus eriocalyx*) et de la lavande (*Lavandula stoechas*)

**Présenté par : MENACEUR Fouad**

**Soutenu le : 01-12-2011**

### Jury :

**Président: M. HAZZIT M.**

Maître de Conférences (ENSA)

**Directeur: Mme FERHAT Z.**

Maître de Conférences (ENSA)

**Co-Directeur: Mme MOUHOUCHE F.**

Professeur (ENSA)

**Examineurs: M. BENCHABANE A.**

Maître de Conférences (ENSA)

**M. BOUSBIA N.**

Maître de Conférences (Univ. Blida)

**Année universitaire : 2011-2012**

## **Remerciements**

*Mes remerciements s'adressent à Madame **FERHAT Zoulikha** maître de conférences à l'ENSA pour avoir accepté de diriger ce travail. Qu'elle trouve ici mes profondes gratitude pour sa gentillesse et sa disponibilité.*

*Monsieur **HAZZIT Mohamed**, vos qualités humaines et votre esprit scientifique sont un exemple à imiter. Sans votre présence et votre aide et votre soutien, ce travail n'aurait pas abouti. Je vous remercie également d'avoir accepté d'assurer la présidence de ce jury.*

*J'adresse mes remerciements à Madame **MOUHOUCHE Faiza**, Professeur à l'ENSA, elle m'a donné beaucoup de son temps pour approfondir mon travail à tous les niveaux.*

*J'adresse mes remerciements à Monsieur **BENCHABANE Ahmed**, Professeur à l'ENSA pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent à Monsieur **BOUSBIA Nabil**, maître de conférences à l'Université de Blida pour avoir eu l'amabilité d'examiner ce travail.*

*Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.*

*Un grand merci aussi pour tous mes collègues du département de Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine ainsi que pour tous amis à l'ENSA.*

## *Dédicaces*

*A ma grand-mère (Que la miséricorde de Dieu soit sur elle)*

*Mes grands parents*

*Mes oncles et mes tantes*

*Mes cousins et cousines*

*Adel, Ali, Walid, Seddik, Miloud, Rymba, Bilal, Jalal, Mourad, Sobhi, Salah, Chahinez, Soraya, Asma, Tydia, Youcef, Tayeb, Sabrina, Naziha, Amel et Abdou.*

## *Liste des abréviations*

- **µg** : Microgramme
- **µl** : Microlitre
- **ADN**: Acide Désoxyribonucléique
- **AFNOR** : Association Française de Normalisation
- **AG** : Acide Gallique
- **ANOVA** : Analyse de la Variance
- **ARN** : Acide Ribonucléique
- **av J-C** : avant Jésus Christ
- **aw** : Activité de l'eau
- **BHA** : Butyl Hydroxy Anisol
- **BHT** : Butyl Hydroxy Toluène
- **CO<sub>2</sub>**: Dioxyde de Carbone
- **CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse
- **CPG/SM** : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse
- **d** : Densité relative :
- **DL<sub>50</sub>** : Dose létale pour 50% de la population
- **DMAPP** : Diméthylallyl diphosphate
- **DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- **E°**: Potentiel Standard de Réduction
- **eq** : équivalent
- **mg eq AG** : milligramme équivalent d'Acide Gallique
- **mg eq Querc** : milligramme équivalent de Quercétine
- **etc** : et cætera
- **FID** : Détecteur à ionisation de flamme
- **FPP** : Farnesyl diphosphate
- **g**: gramme
- **GPP** : diméthylallyl diphosphate
- **Gr.** : grossissement
- **Gy** : Gray
- **h** : heure
- **HE** : huile essentielle
- **HIV** : Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)
- **HR** : Humidité Relative
- **I(%)** : Pourcentage d'inhibition ou activité antioxydante
- **IC<sub>50</sub>** : concentration inhibitrice de 50% des radicaux
- **IK** : Indice de Kovats
- **kcal** : KiloCalorie
- **Kg** : kilogramme
- **IPP** : Isopentenyl diphosphate
- **LDL** : Low-density lipoprotein (Lipoprotéines de basse densité)
- **Log** : Logarithme décimal

- **mBar** : milliBar
- **MEP**: Méthylerythritol phosphate
  
- **mg** : milligramme
- **min** : minute
- **ml** : millilitre
- **mm** : millimètre
- **mol** : mole
- **MVA** : Acide mévalonique
- **MVF** : Matière Végétale Fraiche
- **nm** : nanomètre
- **P** : Poids en grammes
- **PAL**: Phénylalanine Ammonium Lyase
- **pH** : potentiel d'Hydrogène
- **R**: Rendement
- **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire
- **s**: seconde
- **Sen** : Photosensibilisateur
- **SM** : Spectroscopie de masse
- **T**: Température
- **TBHQ** : Ter-Butyl-hydroxy-quinone
- **TL<sub>50</sub>** : Temps létal pour 50% de la population
- **t<sub>R</sub>** : Temps de rétention :
- **UV** : Ultra Violet
- **V** : Volume
- **α** : Alpha
- **β** : Beta
- **γ** : Gamma
- **λ** : Lamda
- **o**: Ortho

## *Sommaire*

<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique .....</b>	<b>4</b>
<b>Chapitre 1 : Les huiles essentielles .....</b>	<b>4</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Historique .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Définitions.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Localisation et lieu de synthèse.....</b>	<b>6</b>
<b>4. Voies de biosynthèse .....</b>	<b>6</b>
<b>5. Rôles physiologiques .....</b>	<b>11</b>
<b>6. Techniques d'extraction des huiles essentielles .....</b>	<b>11</b>
<b>7. Conservation des huiles essentielles .....</b>	<b>16</b>
<b>8. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles .....</b>	<b>17</b>
<b>9. Traitement des huiles essentielles .....</b>	<b>17</b>
<b>10. Analyse des huiles essentielles .....</b>	<b>18</b>
<b>11. Composition chimique des huiles essentielles .....</b>	<b>22</b>
<b>12. Toxicité des huiles essentielles .....</b>	<b>25</b>
<b>13. Utilisations .....</b>	<b>26</b>
<b>Chapitre 2 : Les composés phénoliques .....</b>	<b>28</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>28</b>
<b>1. Mécanisme général de la biosynthèse des composés phénoliques .....</b>	<b>28</b>
<b>2. Classification des composés phénoliques .....</b>	<b>31</b>
<b>3. Utilisation des polyphénols .....</b>	<b>37</b>
<b>4. Toxicité des produits phénoliques .....</b>	<b>38</b>
<b>Chapitre 3 : Monographie des espèces étudiées .....</b>	<b>39</b>
<b>1. La lavande .....</b>	<b>39</b>
<b>1.1. Généralités.....</b>	<b>39</b>
<b>1.2. Classification .....</b>	<b>41</b>
<b>1.3. Caractères morphologiques .....</b>	<b>42</b>
<b>1.4. Ecologie.....</b>	<b>42</b>
<b>1.5. Aire botanique.....</b>	<b>43</b>

1.6. Huile essentielle de <i>L. stoechas</i> .....	44
1.7. Composés phénoliques .....	45
1.8. Utilisations .....	45
<b>2. Le Romarin .....</b>	<b>46</b>
2.1. Généralités .....	46
2.2. Classification .....	48
2.3. Caractères botaniques .....	49
2.4. Ecologie .....	50
<b>3. La bruche du niébé .....</b>	<b>51</b>
3.1. Caractères généraux de la famille des bruchidae .....	51
3.2. Systématique.....	52
3.3. Répartition géographique.....	52
3.4. Description des stades évolutifs de <i>C. maculatus</i> .....	53
3.5. Distinction des sexes .....	55
3.6. Cycle biologique .....	56
3.7. Dégâts occasionnés par <i>C. maculatus</i> .....	58
3.8. Ennemie naturels .....	58
3.9. Méthodes de lutte contre les ravageurs des denrées stockées .....	59
3.10. Effet des huiles essentielles .....	62
<b>Chapitre 4 : Oxydation et antioxydants.....</b>	<b>64</b>
Introduction .....	64
1. Substrats lipidiques .....	64
2. Phénomène d'oxydation des lipides .....	64
2.1. Mécanisme d'auto-oxydation des lipides .....	65
2.2. Oxydation des lipides par l'oxygène singulet : Photo-oxydation .....	69
2.3. Oxydation enzymatique.....	71
3. Les antioxydants .....	72
3.1. Types d'antioxydants .....	73
3.2. Evaluation de la susceptibilité à l'oxydation et du niveau d'oxydation.....	77
<b>Partie expérimentale.....</b>	<b>83</b>
<b>Chapitre 1 : Matériels et méthodes .....</b>	<b>83</b>

1. Matériel végétal.....	83
2. Matériel entomologique.....	84
3. Coupes anatomiques.....	85
4. Extraction des huiles essentielles.....	85
5. Extraits éthanoliques.....	87
6. Caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques des huiles essentielles.....	88
7. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles.....	89
8. Analyse des extraits éthanoliques.....	93
9. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits.....	95
10. Estimation de l'activité insecticide des huiles essentielles sur <i>Callosobruchus maculatus</i> F.....	98
11. Analyse statistique.....	104
<b>Chapitre 2 : Résultats et discussions.....</b>	<b>105</b>
1. Localisation des sites producteurs des huiles essentielles.....	105
2. Rendements des extractions.....	107
3. Cinétique d'extraction des huiles essentielles.....	110
4. Rendements en extrait éthanolique.....	112
5. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques des huiles essentielles.....	114
6. Caractérisation des huiles essentielles.....	117
7. Composition chimique des extraits éthanoliques.....	133
8. Evaluation de l'activité antioxydante des HE et des extraits étudiés.....	138
9. Activité insecticide de huiles essentielles étudiées.....	148
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>165</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>169</b>

## *Liste des figures*

<b>Figure 1:</b> Schéma de la voie de l'acide mévalonique .....	<b>8</b>
<b>Figure 2:</b> Schéma de la voie du DMAPP .....	<b>9</b>
<b>Figure 3 :</b> Biosynthèse des composés terpéniques.....	<b>10</b>
<b>Figure 4 :</b> Structure de quelques monoterpènes.....	<b>23</b>
<b>Figure 5 :</b> Exemples de sesquiterpènes entrant dans la composition chimique des huiles essentielles.....	<b>24</b>
<b>Figure 6:</b> Structures de quelques dérivés du phénylpropanoïde .....	<b>25</b>
<b>Figure 7:</b> Schéma général des principales voies de biosynthèse des composés phénoliques .....	<b>30</b>
<b>Figure 8:</b> Exemples de phénylpropanoïdes simples.....	<b>32</b>
<b>Figure 9:</b> Exemples de coumarines .....	<b>32</b>
<b>Figure 10:</b> Exemples de dérivés de l'acide benzoïque.....	<b>32</b>
<b>Figure 11:</b> Structure de l'acide gallique et l'acide ellagique .....	<b>34</b>
<b>Figure 12:</b> Structure de base des tannins condensés .....	<b>35</b>
<b>Figure 13:</b> Structure du squelette de base des flavonoïdes .....	<b>36</b>
<b>Figure 14:</b> <i>Lavandula stoechas</i> L.1753.....	<b>43</b>
<b>Figure 15:</b> <i>Rosmarinus eriocalyx</i> JORD. & FOURR .....	<b>50</b>
<b>Figure 16:</b> Schéma d'une vue dorsale du mâle et de femelle de <i>C. maculatus</i> .....	<b>55</b>
<b>Figure 17:</b> Cycle biologique de <i>C. maculatus</i> .....	<b>56</b>
<b>Figure 18:</b> Phase d'initiation.....	<b>65</b>
<b>Figure 19:</b> Phase de propagation.....	<b>67</b>
<b>Figure 20:</b> Formation des produits secondaires par la décomposition des hydroperoxydes.....	<b>68</b>
<b>Figure 21:</b> Phase de terminaison .....	<b>68</b>
<b>Figure 22:</b> Représentation schématique de l'oxydation des acides gras insaturés par l'oxygène atmosphérique (la formation des produits d'oxydation est indiquée par des unités arbitraires en fonction du temps).....	<b>69</b>
<b>Figure 23:</b> Photo-oxydation type 1 .....	<b>70</b>
<b>Figure 24:</b> Photo-oxydation type 2 .....	<b>71</b>
<b>Figure 25:</b> Structure de quelques antioxydants de synthèse .....	<b>74</b>
<b>Figure 26:</b> Structure des tocophérols .....	<b>76</b>

<b>Figure 27:</b> Structure de l'acide ascorbique .....	77
<b>Figure 28:</b> L'élevage de <i>Callosobruchus maculatus</i> F. dans des bocaux en verre à l'intérieur de l'étuve.....	84
<b>Figure 29:</b> Montage de l'appareil de Clevenger-modifié.....	86
<b>Figure 30:</b> Structure de l'acide gallique.....	94
<b>Figure 31:</b> Structure de la quercétine .....	95
<b>Figure 32:</b> Structure du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) .....	97
<b>Figure 33:</b> Protocole de mise en œuvre du test du pouvoir réducteur. ....	98
<b>Figure 34 :</b> Traitement des insectes par les huiles essentielles pour le test inhalation ..	100
<b>Figure 35:</b> Coupe transversale de la feuille de <i>R. eriocalyx</i> mettant en évidence un poil glandulaire (PG) .....	105
<b>Figure 36:</b> Schéma d'un poil glandulaire.....	105
<b>Figure 37:</b> Coupe transversale de la feuille de <i>R. eriocalyx</i> mettant en évidence les poils tecteurs (PT) et sécréteurs (PS) .....	105
<b>Figure 38:</b> Coupe transversale de la tige de <i>L. stoechas</i> mettant en évidence les poils tecteurs (PT) et sécréteurs. ....	106
<b>Figure 39:</b> Coupe transversale d'une feuille de <i>L. stoechas</i> mettant en évidence les poils tecteurs (PT) et sécréteurs (PS).....	106
<b>Figure 40:</b> Schéma d'un poil tecteur et sécréteur .....	106
<b>Figure 41:</b> Cinétique d'extraction de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> . ....	110
<b>Figure 42:</b> Rendement en extrait éthanolique des deux plantes étudiées. ....	112
<b>Figure 43:</b> Chromatogramme CPG de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> sur colonne DB-5.....	119
<b>Figure 44:</b> Chromatogramme CPG de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> sur colonne HP-5 .....	120
<b>Figure 45:</b> Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> .....	121
<b>Figure 46:</b> Familles chimiques de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> . ....	122
<b>Figure 47:</b> Principaux composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Lavandula stoechas</i> .....	123
<b>Figure 48:</b> Chromatogramme CPG de l'huile essentielle de <i>R. eriocalyx</i> .....	128
<b>Figure 49:</b> Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle de <i>R. eriocalyx</i> sur colonne polaire.....	129
<b>Figure 50:</b> Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle de <i>R. eriocalyx</i> sur colonne non polaire HP5-MS.....	130

<b>Figure 51:</b> Familles des composés identifiés de l'huile essentielle de <i>R. eriocalyx</i> .....	<b>131</b>
<b>Figure 52:</b> Principaux composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>R. eriocalyx</i> .....	<b>131</b>
<b>Figure 53:</b> Teneurs en phénols totaux des deux espèces étudiées .....	<b>134</b>
<b>Figure 54:</b> Teneurs en flavonoïdes des extraits de <i>R. eriocalyx</i> et <i>L. stoechas</i> .....	<b>136</b>
<b>Figure 55:</b> Réaction de réduction du radical <b>DPPH</b> par un antioxydant <b>AH</b> .....	<b>139</b>
<b>Figure 56:</b> Concentrations pour 50% d'inhibition des radicaux libres du BHT et des extraits de <i>R. eriocalyx</i> et <i>L. stoechas</i> .....	<b>143</b>
<b>Figure 57:</b> Mortalité corrigée des adultes de <i>C. maculatus</i> par inhalation des d'huiles essentielles en fonction du temps.....	<b>150</b>
<b>Figure 58:</b> Détermination des TL <sub>50</sub> et TL <sub>90</sub> de l'huile essentielle de <i>R. eriocalyx</i> par effet inhalation vis-à-vis de <i>C. maculatus</i> .....	<b>151</b>
<b>Figure 59:</b> Détermination des TL <sub>50</sub> et TL <sub>90</sub> de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> par effet inhalation vis-à-vis de <i>C. maculatus</i> .....	<b>151</b>
<b>Figure 60:</b> Mortalité corrigée des adultes de <i>C. maculatus</i> par effet contact en fonction des doses d'huiles essentielles. ....	<b>153</b>
<b>Figure 61:</b> Détermination des DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> de l'huile essentielle de <i>R. eriocalyx</i> par contact. ....	<b>155</b>
<b>Figure 62:</b> Détermination des DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> par contact .....	<b>155</b>
<b>Figure 63:</b> Nombre d'œufs pondus par femelle de <i>C. maculatus</i> traitée à l'huile essentielle de <i>R. eriocalyx</i> .....	<b>157</b>
<b>Figure 64:</b> Evolution du nombre d'œufs pondus moyen par femelle de <i>C. maculatus</i> traitée à l'huile essentielle de romarin en fonction du temps. ....	<b>158</b>
<b>Figure 65:</b> Nombre d'œufs pondus par femelle de <i>C. maculatus</i> traitée à l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> . ....	<b>159</b>
<b>Figure 66:</b> Evolution du nombre d'œufs pondus moyen par femelle de <i>C. maculatus</i> traitée à l'huile essentielle de lavande en fonction du temps. ....	<b>160</b>
<b>Figure 67:</b> Variation du pourcentage moyen d'émergence de <i>C. maculatus</i> en fonction des doses des huiles essentielles de romarin et de lavande .....	<b>162</b>

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Effet du substituant sur la couleur de l'anthocyanidine .....	37
<b>Tableau 2:</b> Teneurs en composés majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces de lavande. ....	40
<b>Tableau 3:</b> Composés majoritaires des huiles essentielles de différentes sous-espèces de <i>L. stoechas</i> du Portugal et d'Espagne. ....	44
<b>Tableau 4:</b> Ennemies naturels de <i>C. maculatus</i> . ....	59
<b>Tableau 5:</b> Mécanisme d'oxydation des lipides .....	65
<b>Tableau 6:</b> Espèces de lamiacées étudiées.....	83
<b>Tableau 7:</b> Comparaison des rendements en huile essentielle de quelques espèces de lavande. ....	108
<b>Tableau 8:</b> Rendements en huile essentielle de deux espèces de romarin.....	109
<b>Tableau 9:</b> Rendement en extrait sec de deux échantillons de <i>Lavandula stoechas</i> .....	113
<b>Tableau 10:</b> Rendements en extrait sec de deux espèces de romarin .....	113
<b>Tableau 11:</b> Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> .....	115
<b>Tableau 12:</b> Propriétés organoleptiques et physiques de l'huile essentielle de <i>R. eriocalyx</i> . ....	116
<b>Tableau 13:</b> Composition chimique de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de <i>Lavandula stoechas</i> .....	117
<b>Tableau 14:</b> Teneurs en composés majoritaires de quelques échantillons de <i>L. stoechas</i> .....	124
<b>Tableau 15:</b> Composition chimique de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> .....	125
<b>Tableau 16:</b> Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles de quelques échantillons de <i>R. eriocalyx</i> .....	132
<b>Tableau 17:</b> Teneurs en polyphénols des extraits de deux espèces de romarin.....	135
<b>Tableau 18:</b> Comparaison entre les teneurs en polyphénols des extraits de trois espèces de lavande .....	135
<b>Tableau 19:</b> Comparaison des teneurs en flavonoïdes de trois échantillons de romarin.....	137
<b>Tableau 20:</b> Teneurs en flavonoïdes de deux échantillons de <i>L. stoechas</i> .....	138

<b>Tableau 21:</b> Résultats du test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par le BHT et les huiles essentielles de romarin et de lavande.....	<b>140</b>
<b>Tableau 22:</b> Analyse de la variance de l'activité de piégeage du DPPH pour les deux huiles essentielles étudiées.....	<b>141</b>
<b>Tableau 23:</b> Résultats du test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par le BHT et les extraits de romarin et de lavande.....	<b>142</b>
<b>Tableau 24:</b> Analyse de la variance de l'activité de piégeage du DPPH pour les deux extraits étudiés .....	<b>144</b>
<b>Tableau 25:</b> Pouvoir réducteur du BHT et des huiles essentielles de <i>R. eriocalyx</i> et <i>L. stoechas</i> .....	<b>145</b>
<b>Tableau 26:</b> Analyse de la variance du pouvoir réducteur des huiles essentielles étudiées .....	<b>146</b>
<b>Tableau 27:</b> Pouvoir réducteur du BHT et des extraits de <i>R. eriocalyx</i> et <i>L. stoechas</i> ..	<b>147</b>
<b>Tableau 28:</b> Analyse de la variance du pouvoir réducteur pour les deux extraits étudiés .....	<b>148</b>
<b>Tableau 29:</b> TL <sub>50</sub> et TL <sub>90</sub> des huiles essentielles de romarin et de lavande.....	<b>152</b>
<b>Tableau 30:</b> DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> des huiles essentielles de romarin et de lavande.....	<b>156</b>
<b>Tableau 31:</b> Analyse de la variance de la mortalité des adultes de <i>C. maculatus</i> par effet contact.....	<b>156</b>
<b>Tableau 32:</b> Analyse de la variance de la fécondité des femelles de <i>C. maculatus</i> .....	<b>161</b>
<b>Tableau 33:</b> Analyse de la variance de la fertilité des œufs de <i>C. maculatus</i> exprimée par les deux huiles essentielles .....	<b>164</b>

## *Introduction générale*

## Introduction générale :

Les plantes aromatiques occupent une place importante dans notre vie, ainsi elles trouvent des utilisations dans plusieurs domaines: en agroalimentaire, parfumerie, cosmétique, médecine....ceci est dû en grande partie à leurs teneurs en substances biologiquement actives.

Ces dernières sont issues du métabolisme secondaire des végétaux, et sont représentés principalement par les huiles essentielles et les composés phénoliques.

L'Algérie recèle un patrimoine végétal très riche, mais par manque d'informations sur les richesses qu'il peut probablement engendrer, celui-ci est malheureusement très peu exploité.

L'oxydation des lipides est l'un des problèmes majeurs en agroalimentaire, à cause de la formation des produits d'oxydation, qui sont responsables des odeurs indésirables et de la diminution des qualités organoleptique, nutritionnelle, et microbiologique des aliments.

Pour prévenir le processus de dégradation des lipides, l'industrie agroalimentaire utilise des antioxydants chimiques à des doses bien définies; ces additifs sont de faible coût et d'une grande stabilité. Néanmoins, de tels antioxydants de synthèse peuvent présenter une certaine toxicité pour l'homme. En effet, le BHT, le BHA, et le TBHQ sont suspectés d'avoir des effets négatifs sur la santé (**Paradiso et al., 2006**).

De nombreuses études s'orientent vers la recherche d'antioxydants naturels parfaits, à la fois sûrs et efficaces.

Les insectes de la famille des Bruchideae occasionnent des dégâts très importants en termes de poids et de qualité sur les cultures de légumineuses à graines, et constituent sans aucun doute une des contraintes majeures à leur développement.

*Callosobruchus maculatus* (Bruche du niébé) est considéré comme l'un des plus nuisibles des stocks de graines de légumineuses et peut porter ainsi une atteinte grave à la sécurité alimentaire.

Le développement de cette espèce est à l'origine des dommages et des pertes occasionnés sur le pois chiche (*Cicer arietinum*) qui constitue l'une des principales légumineuses consommées en Algérie.

L'utilisation d'insecticides de synthèse pendant plusieurs années a entraîné de nombreux problèmes, entre autres le développement de résistance chez les insectes et la présence de résidus de pesticides dans les denrées stockées.

Cette situation a suscité depuis quelques années l'orientation de la recherche vers les produits naturels issus des plantes comme une alternative pour lutter contre les ravageurs des denrées stockées.

Des études récentes signalent que des extraits naturels des plantes appartenant à la famille des Lamiacées, entre autres la lavande et le romarin sont dotés de fortes activités biologiques qui peuvent constituer des alternatives potentiels pour les agents chimiques couramment utilisés pour la prévention de l'altération des aliments par oxydation, ou dans le contrôle des populations d'insectes dans les denrées stockées.

Parmi les plantes aromatiques et médicinales spontanées, notre travail s'est porté sur le romarin (*Rosmarinus eriocalyx* Jord et Fourr) et la lavande (*Lavandula stoechas* L.) faisant l'objet de plusieurs recherches dans le monde, et ceci à travers une étude détaillée de la composition chimique, de l'activité antioxydante et insecticide des huiles essentielles et extraits éthanoliques de ces dernières:

- Une première partie sera consacrée à l'extraction, à la caractérisation des huiles essentielles et des composés phénoliques de *Rosmarinus eriocalyx* et *Lavandula stoechas*.

- La deuxième partie visera l'évaluation de l'activité antioxydante *In Vitro* des huiles essentielles et des extraits éthanoliques.

- La troisième étape de notre travail consistera en une étude de l'activité insecticide des huiles essentielles, contre *Callosobruchus maculatus* et ceci en testant leurs effets sur la mortalité des adultes selon deux modes de pénétration (contact et inhalation), sur la fécondité des femelles et sur la fertilité des œufs de ce ravageur.

## *Partie bibliographique*

- *Chapitre 1 : Les huiles essentielles*
- *Chapitre 2 : Les composés phénoliques*
- *Chapitre 3 : Monographie des espèces étudiées*
- *Chapitre 4 : Oxydation et antioxydants*

➤ ***Chapitre 1 : Les huiles essentielles***

## **Introduction :**

De tout temps, le règne végétal a offert à l'Homme des ressources essentielles à son alimentation, à son hygiène et sa santé. Depuis les temps les plus anciens, les hommes ont utilisé des plantes aromatiques tant pour vénérer leurs dieux que pour se soigner.

Les huiles essentielles constituent la fraction volatile des métabolites secondaires produits par les végétaux. Depuis l'antiquité, ces substances ont été valorisées pour leurs propriétés culinaires et odorantes (**Parry, 1969**).

## **1. Historique :**

La nomination 'huile essentielle' dérive du terme '*huile quintessentielle*'. Ceci provient de l'idée aristotélicienne que la matière se compose de quatre éléments, à savoir : l'air, la terre, le feu, et l'eau. Le cinquième élément, ou la *quintessence*, a été alors considéré comme l'esprit ou la force de la vie (**Baser et Gerhard, 2010**).

5000 ans avant notre ère, un alambic en terre cuite a été découvert au Pakistan.

De petites amphores ayant semble-t-il contenues des essences et parfums ont été retrouvées dans les sarcophages des rois. L'essence de térébenthine était déjà utilisée et tout porte à penser que certains parfums étaient déjà obtenus sous forme d'huiles distillées.

Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses.

Dans les civilisations chinoise et indienne, on trouve la trace d'utilisations médicinales très anciennes. Le premier livre de matière médicale, "**Traité des plantes médicinales de l'empereur Shen Nung**", fut rédigé vers 2900 avant J.C.

Les grands médecins grecs, dont le plus célèbre est Hippocrate (5ème siècle av. J.C.), utilisaient couramment les narcotiques, les laxatifs ou des émétiques

(vomitifs). Théophraste (370-285 av. J.-C.) classe les plantes dans son ouvrage "Historia plantarum " (**Fouché et al., 2000**).

C'est Geber (721-815), qui mentionna le premier de façon écrite, la description de la distillation «sèche» et celle par intermédiaire de l'eau, mais l'alambic reste incontestablement associé à Avicenne (930-1037).

Giovanni Baptista della Porta (1540-1615), dans son célèbre ouvrage "**De distillatione**" parut en 1567, mentionne les connaissances avancées des Arabes dans le domaine de la distillation.

Ensuite, les huiles essentielles vont bénéficier des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique.

En 1866, le terme " terpène " fut utilisé pour la première fois par Kekule désignant la classe des composés les plus répandus des huiles essentielles.

En 1953, le chimiste Léopold Ruzika proposa une nomenclature pour les dérivés isopréniques.

Depuis, l'ère industrielle a pris peu à peu le pas sur un certain empirisme et développa ainsi de nouvelles techniques de distillation.

## **2. Définition :**

De très nombreux auteurs ont tenté de donner une définition des huiles essentielles. L'AFNOR donne la définition suivante (Norme NF T 75-006) : « l'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation «sèche». L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques» (**AFNOR, 2000**).

Cette définition détermine les huiles essentielles au sens strict. Mais, de ce fait, elle écarte les produits obtenus, toujours à partir de matière première végétale, mais en employant d'autres procédés d'extraction, comme l'utilisation de solvants non aqueux ou l'enfleurage (**Besombes, 2008**).

Ces composés volatils ont la propriété de se solubiliser dans les huiles et les graisses et par la même ont reçu empiriquement le nom d'huile essentielle, le terme huile souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances, le terme essentiel se comprenant comme la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons (**Bruneton, 1993**).

### **3. Localisation et lieu de synthèse :**

Les huiles essentielles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et se forment dans le cytoplasme de certaines cellules végétales spécialisées (**Farhat, 2010**).

Elles peuvent être stockées et emmagasinées dans diverses structures de la plante telles que les poils sécréteurs ou les trichomes, les cellules épidermiques, les cellules sécrétrices internes, les poches sécrétrices et les canaux sécréteurs.

Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe.

Les trichomes glandulaires sont les sites primaires de la biosynthèse d'huile essentielle, et les plantes qui manquent de telles structures spécialisées synthétisent et amassent seulement des traces de monoterpènes. En conséquence, la dynamique du développement de ces structures ainsi que le processus sécréteur et le mécanisme ont une incidence indirecte avec la production d'huile et le potentiel du système producteur (**Sharma et al., 2003**).

### **4. Voies de biosynthèse :**

Tous les terpènes dérivent de l'union de composés ayant le squelette ramifié de l'isopentane.

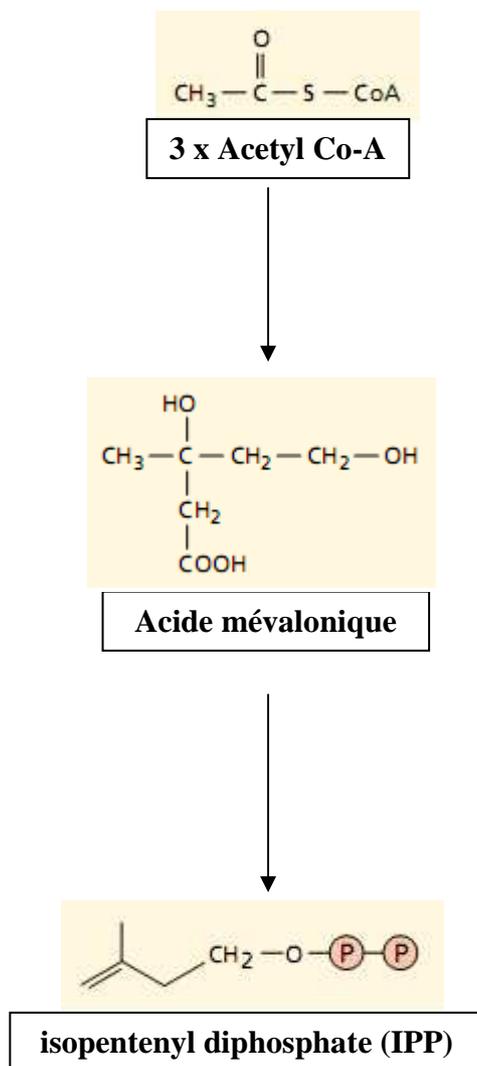
Les éléments structuraux de base des terpènes sont parfois appelés : **Unités isopréniques** car les terpènes peuvent se décomposer à haute températures pour donner l'isoprène.

Les composés terpéniques sont classés en fonctions du nombre d'unités 5 carbones qu'ils contiennent. Les terpènes à dix carbones ; qui contiennent deux unités isopréniques sont appelés: **monoterpènes**; à 15 carbones : **sesquiterpènes**, ceux qui en contiennent 20 carbones: **diterpènes**, 30 carbones : **triterpènes**, 40 carbones: **tetraterpènes**,  $(C_5)_n$  avec  $n > 8$  : **polyterpénoïdes**.

Selon **Lichtenthaler (1999)**, les composés terpéniques sont synthétisés à partir des métabolites primaires suivant au moins deux voies différentes :

Dans la voie la plus élucidée connue sous le nom de la voie de l'acide mévalonique; 3 molécules d'Acetyl Co-A sont jointes à l'aide des enzymes **acetyl-CoA acyltransferase** et **hydroxymethylglutaryl-CoA synthase** pour former un composé intermédiaire à 6 carbones: l'**hydroxymethylglutaryl (HMG)** qui après une étape de réduction donne l'**acide mévalonique (MVA)**.

L'acide mévalonique est considéré comme un intermédiaire clé de cette voie de biosynthèse. Il subit ensuite des réactions de pyrophosphorylation, décarboxylation et de déshydratation pour aboutir à l'**isopentenyl diphosphate (IPP)**.



**Figure 1:** Schéma de la voie de l'acide mévalonique (Taiz et Zeiger, 2002).

Récemment, il a été démontré que l'IPP pouvait aussi être synthétisé à partir des composés intermédiaires de la glycolyse ou de la photosynthèse via une autre série de réactions appelée la voie du **méthylerythritol phosphate (MEP)**, cette voie est opérationnelle dans les chloroplastes (Lichtenthaler, 1999).

Dans cette voie, une molécule de **pyruvate** et une de **glyceraldéhyde-3-phosphate** se combinent pour former le **méthylerythritol phosphate (MEP)**, ce dernier subit à son tour une série de réactions permettant la formation du **diméthylallyl diphosphate (DMAPP)**; un composé à 5 carbones qui peut éventuellement être converti en l'**isopentenyl diphosphate (IPP)**.

La figure 2 illustre les étapes de la voie du DMAPP.

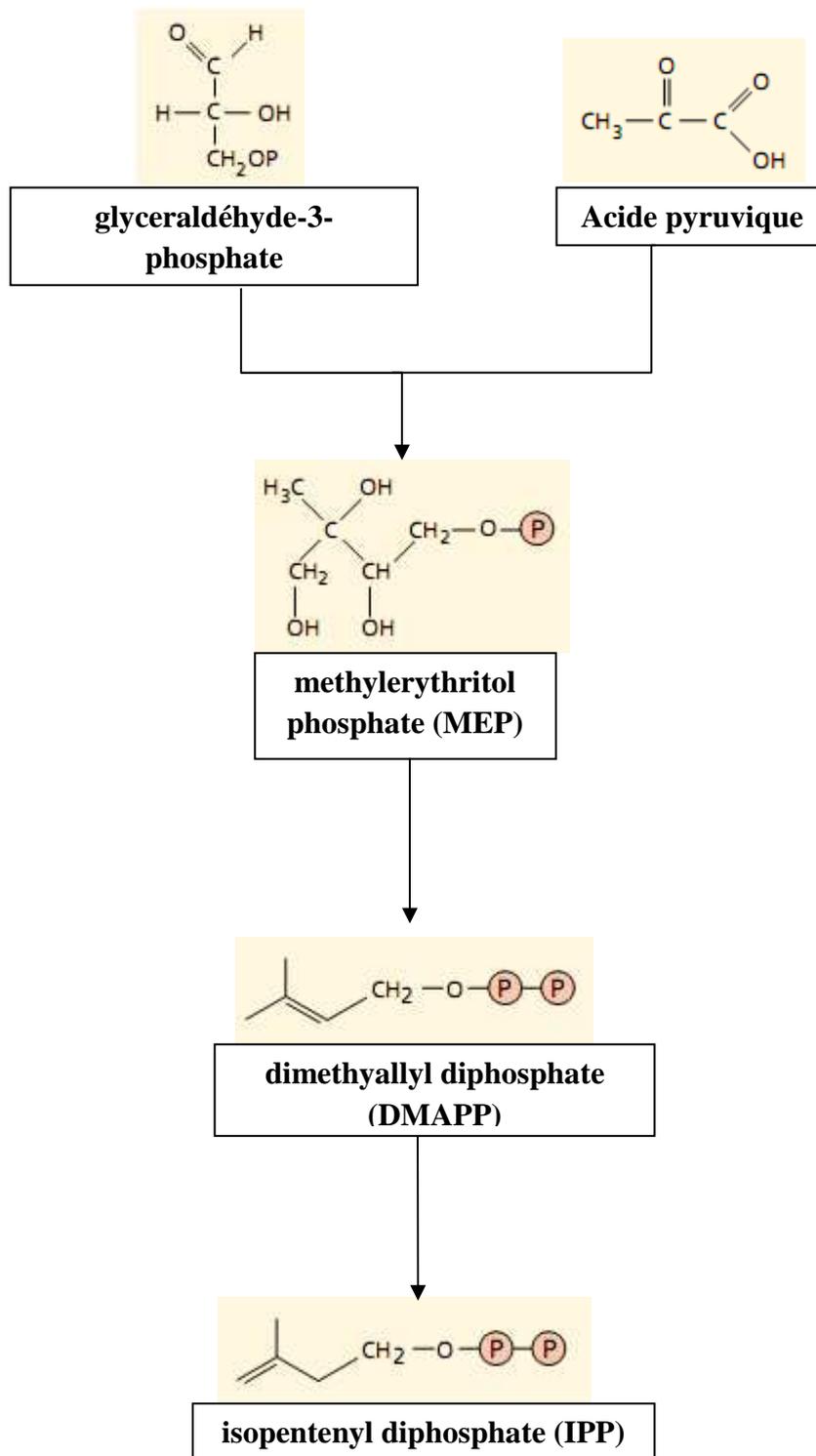


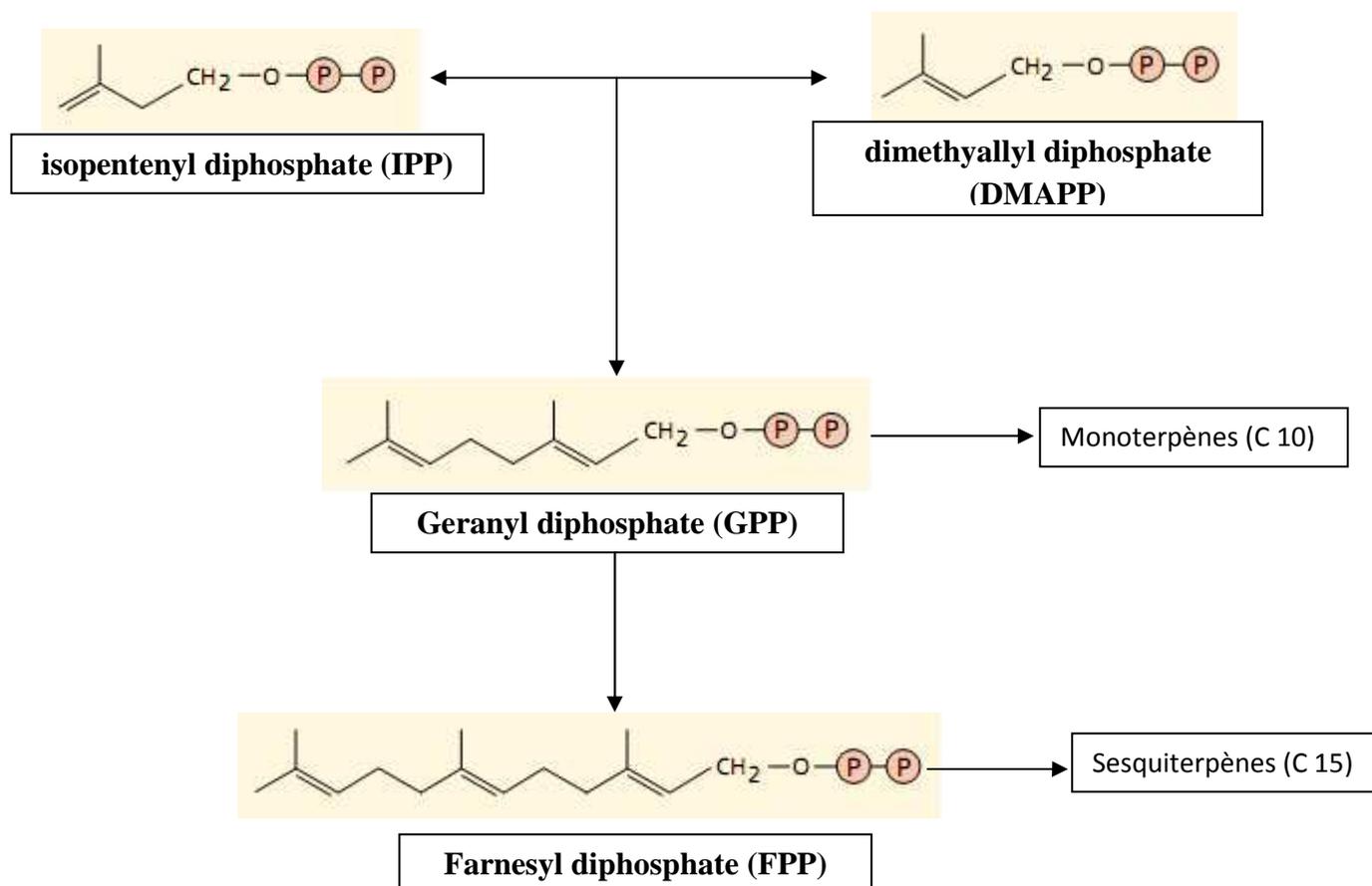
Figure 2: Schéma de la voie du DMAPP (Taiz et Zeiger, 2002).

L'isopentenyl diphosphate et son isomère, le diméthylallyl diphosphate se joignent pour donner des molécules plus grandes.

Leur combinaison permet la synthèse du **géranyl diphosphate (GPP)**; un composé à 10 carbones considéré comme le précurseur de tous les monoterpènes rencontrés dans la composition des huiles essentielles.

Le GPP peut réagir avec une autre molécule de IPP, ce qui mène farnesyl diphosphate (15 atomes de carbone); précurseur de la majorité des composés sesquiterpéniques.

Ces réactions sont expliquées dans la figure 3.



**Figure 3:** Biosynthèse des composés terpéniques (Taiz et Zeiger, 2002).

## 5. Rôles physiologiques :

Les composés terpéniques possèdent un caractère toxique et répulsif vis-à-vis de nombreux insectes ravageurs de plantes, ainsi ils semblent jouer un rôle de défense important dans le règne végétal (**Gershenzon et Croteau, 1992**).

Par exemple, les esters de monoterpène pyrethroids qui se produisent dans les feuilles et les fleurs des espèces de *Chrysanthemum* montrent une activité insecticide très saisissante.

Les huiles essentielles offrent aussi un caractère de toxicité pour la plante vis-à-vis des herbivores potentiels avant même que ces derniers fassent une morsure d'essai (**Taiz et Zeiger, 2002**).

Ces substances attirent les ennemis naturels des ravageurs, ce qui empêche la manifestation d'autres dégâts (**Turlings et al., 1995; Kessler et Baldwin, 2001**).

Les pyrethroids naturels sont des substances généralement utilisées comme insecticides parce qu'ils sont caractérisés par une faible persistance dans l'environnement et une toxicité négligeable vis-à-vis des mammifères (**Taiz et Zeiger, 2002**).

## 6. Techniques d'extraction des huiles essentielles :

### 6.1. Expression à froid :

L'expression à froid est une extraction sans chauffage réservée aux agrumes. Le principe de ce procédé mécanique est fondé sur la rupture des péricarpes riches en huiles essentielles. L'huile essentielle ainsi libérée est entraînée par un courant d'eau. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation (**Kimball, 1999; Ferhat, 2007**).

Cette technique permet l'expression à froid de l'huile essentielle des agrumes sans emploi d'eau, ce qui évite ainsi des altérations telles les hydrolyses ou les solubilisations de certaines classes de composés aromatiques (**Martini, 1999**).

## **6.2. Hydrodistillation:**

C'est la méthode la plus ancienne et polyvalente pour l'obtention des huiles essentielles. Dans ce procédé, le matériel végétal est submergé d'eau qui est chauffée pour produire de la vapeur riche en substances aromatiques.

Cette méthode donne de très bons résultats avec des poudres ou des matériels végétaux durs comme les graines et les racines.

La production de la vapeur en utilisant un chauffage direct du végétal entraînerait des réactions d'hydrolyse ce qui va causer la perte de certains esters aromatiques **(Lee et Lee, 2003)**.

## **6.3. Entraînement à la vapeur :**

Dans cette technique une source externe de vapeur d'eau est utilisée. La vapeur d'eau passe à travers du matériel végétal au niveau de l'unité d'extraction et sort par le condenseur.

Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle » **(Meyer-Warnod, 1984)**.

Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en deux phases bien distinctes: l'huile essentielle et l'eau aromatique (hydrolat).

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile **(Lucchesi, 2005)**.

## **6.4. Hydrodistillation assistée par ultrason :**

Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement « pré » ou « post » opératoire. En effet, les micro-cavitations générées par les ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines celluloses.

Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation des constituants des huiles essentielles. Dans certains cas, les rendements en huile essentielle sont augmentés et les cinétiques accélérées.

Ainsi, l'avantage essentiel de cette technique est de permettre une diffusion plus rapide du solvant à l'intérieur du matériel végétal ce qui se traduit par une réduction de la durée d'extraction (**Vinatoru, 2001**).

### **6.5. Hydrodistillation assistée par micro-ondes :**

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes est l'une des techniques d'extraction des huiles essentielles les plus récentes. Elle a été développée en remplaçant l'énergie solaire par un chauffage micro-ondes plus performant, plus spécifique et beaucoup moins polluant qu'un chauffage traditionnel au feu (**Lucchesi, 2005**).

Cette technique permet l'extraction de l'huile essentielle en utilisant uniquement l'eau de constitution des matières premières fraîches.

Par conséquent, l'extraction consomme moins d'énergie car elle ne nécessite pas de chauffer l'eau recouvrant le végétal comme en hydrodistillation ou de disposer d'un générateur de vapeur comme en distillation à la vapeur.

De plus, le volume de condensats est alors réduit à la seule eau de constitution du végétal (**Anizon et al., 2002**).

### **6.6. Extraction au moyen de solvant :**

L'extraction des huiles essentielles au moyen de solvant organique est une méthode connue depuis longtemps. Cette méthode est utilisée pour récupérer les arômes et les huiles essentielles à partir d'organes fragiles sans causer une

dégradation thermique de ceux-ci. Dans ce mode d'extraction on peut utiliser soit des solvants volatils soit fixes.

#### **6.6.1. Extraction par solvants volatils :**

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique.

Du fait de l'utilisation de solvants organiques, cette technique présente toutefois des inconvénients qu'il est important de noter. En effet, l'intervention de solvants organiques peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des impuretés parfois difficile à éliminer (**Lucchesi, 2005**).

#### **6.6.2. Extraction par solvant fixes :**

- **Enfleurage :**

Cette technique est particulièrement adaptée aux fleurs fragiles (jasmin, tubéreuse...), ces dernières conservent leur odeur après la cueillette, mais elles la perdent sous l'action de la chaleur.

Des surfaces planes en verre, supportées par un châssis en bois, sont recouvertes, sur leurs deux faces, d'une couche de graisse inodore, souvent de la graisse animale raffinée. Après cette opération, les fleurs sont réparties sur ce « lit » de graisse.

Grâce à son pouvoir d'absorption, la graisse capture les constituants du parfum exhalés par la matière première. Les châssis sont retournés régulièrement afin d'éliminer les fleurs « vidées » de leur parfum. Une même couche de graisse est utilisée jusqu'à sa saturation en parfum (**Besombes, 2008**).

### ▪ **Macération :**

Il s'agit d'une variante de la technique précédente, réservée aux fleurs un peu moins fragiles, comme la violette, la fleur d'oranger et la cassie (**Besombes, 2008**).

Cette technique connue aussi sous le nom de l'enfleurage à chaud est l'une des plus anciennes méthodes utilisées pour préserver les parfums des plantes (**Lee et Lee, 2003**).

L'extraction est réalisée par immersion des fleurs fraîchement cueillies et constamment renouvelées dans un bac de graisses chaudes jusqu'à atteindre la saturation. Un épuisement à l'alcool absolu est généralement appliqué sur cette graisse (**Blackeway et Salerno, 1987**).

### **6.7. Extraction par fluide à l'état supercritique :**

C'est un autre type d'extraction au moyen de solvant ou le CO<sub>2</sub> est mis sous haute pression pour extraire l'huile essentielle et l'oléorésine au même temps (**Lee et Lee, 2003**).

Ce procédé est basé sur le fait que le CO<sub>2</sub> dans des conditions dites critiques (fortes pressions) présente un pouvoir de dissolution accru vis-à-vis de divers composés tels que les huiles essentielles, les arômes et les colorants (**Mayer, 1989**).

Le CO<sub>2</sub> présente de multiples avantages. Il est peu coûteux, peu toxique, ininflammable et chimiquement inerte. Sa température critique et pression critique facilement accessibles sont compatibles avec les composés thermiquement instables. En outre, son état gazeux à pression atmosphérique permet de le séparer spontanément du produit final et d'éviter ainsi la présence de solvants résiduels (**Ziemons, 2007**).

### **6.8. La Flash-Détente :**

Ce procédé comprend 2 étapes :

**1ère étape:** L'utilisation d'une vis à injection de vapeur assure l'étuvage du matériel végétal à 85-90°C. Cette étape de blanchiment, nécessaire à la mise en œuvre du procédé, permet d'inhiber l'activité enzymatique endogène et de détruire la flore bactérienne.

**2ème étape:** Consiste en une détente avec l'introduction brutale sous vide (environ 30 mBar) du matériel végétal. La température d'ébullition de l'eau dans ces conditions de vide se situe entre 27 et 30°C.

Cette mise sous vide provoque donc l'évaporation brutale d'une partie de l'eau de constitution du matériel végétal étuvé (environ 10% de la masse humide initiale) et une chute brutale de la température du milieu. Cette perte d'eau engendre un broyage fin dû à la création de micro-canaux intercellulaires.

Ce bouleversement et cette explosion cellulaire confèrent aux produits des qualités physico-chimiques, rhéologiques et organoleptiques bien particulières.

Les eaux d'évaporation sont récupérées par condensation: ces eaux, particulièrement riches en composés volatils aromatiques, sont appelées eaux aromatiques et pourront être réintroduites dans les produits après Flash-Détente (**Besombes, 2008**).

### **7. Conservation des huiles essentielles :**

Il est possible de réduire l'instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles en utilisant des flacons de faible volume en aluminium, en acier inoxydable ou en verre brun, entièrement remplis et fermés de façon étanche, stockés à basses température, ou conservés sous atmosphère d'azote. On peut également recourir à l'adjonction d'autres antioxydants (**Bruneton, 1993**).

## 8. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles :

Les propriétés physiques des huiles essentielles leur ont permis d'avoir une place à part dans la palette des ressources du monde végétal.

Les huiles essentielles sont des substances généralement liquides, très légères, de densité inférieure à celle de l'eau ( $0,750 < d < 0,990$ ), sauf celle de cannelle et de girofle.

Les huiles essentielles sont souvent colorées en jaunes pâle ou incolore à température ambiante à l'exception des huiles essentielles de camomille, romarin qui est de couleur bleue claire.

Les huiles essentielles ne rancissent pas et sont solubles dans l'alcool et dans tous les solvants organiques (chloroforme, éther de pétrole, benzène, etc.) mais sont insolubles dans l'eau. Leur indice de réfraction est généralement élevé (**Bernard et al., 1988**).

## 9. Traitement des huiles essentielles :

Les qualités organoleptiques des huiles essentielles sont surtout exploitées dans l'industrie des arômes alimentaires et de la parfumerie. Dans ces domaines, les essences sont souvent modifiées, neutralisées, décolorées, rectifiées pour éliminer certains produits indésirables potentiellement irritants, allergènes ou photosensibilisants (**Pibiri, 2005**).

### ▪ La rectification :

C'est une distillation sous vide qui permet d'éliminer les traces d'eau, les matières solubles ou résineuses et les colorants.

Elle consiste à séparer plusieurs constituants d'un mélange liquide par échange de matière entre une phase vapeur et une phase liquide, au moyen d'une série de vaporisations et de condensations entre ce liquide et cette vapeur qui chemine à contre courant dans une colonne. Elle permet de séparer des constituants de mélanges liquides dans un état de grande pureté.

- **La déterpénation :**

Cette opération est basée sur le fait que les composés terpéniques ne jouent qu'un rôle mineur dans l'arôme des huiles essentielles et aussi dans le but de concentrer les composés intéressants et d'augmenter leurs solubilité dans un milieu aqueux.

La déterpénation peut être effectuée par distillation fractionnée, par extraction sélective, par une combinaison de ces deux procédés ou encore par chromatographie.

- **La sesquidéterpénation :**

La distillation ne permet pas, dans les conditions utilisées, d'éliminer les sesquiterpènes; cette opération, réalisée par extraction sélective ou chromatographie, conduit à des huiles sesquidéterpénées.

- **La concentration :**

La concentration consiste à déterpéner partiellement les huiles essentielles par distillation et est généralement utilisée pour les huiles essentielles d'agrumes (Crouzet, 1998 ; Cicile, 1994, 2002)

## **10. Analyse des huiles essentielles :**

### **10.1. Analyse olfactive :**

L'examen olfactif qui précède ou suit toute analyse d'huile essentielle est du plus grand intérêt car, si l'odeur de l'huile essentielle n'est pas satisfaisante, il importe peu que les constantes physico-chimiques soient correctes : le produit doit être rejeté.

Cet essai olfactif est conduit par comparaison avec un échantillon type de l'huile essentielle aussi frais que possible et conservé dans les meilleures conditions. Cet examen doit être effectué soit par un parfumeur responsable du contrôle de la qualité, soit par un panel d'experts.

Il est d'autant plus utile qu'avec les progrès de l'analyse et de la synthèse chimique on peut parvenir à donner à une huile essentielle falsifiée ou même reconstituée les caractéristiques physico-chimiques du produit pur (Garnero, 1996).

## 10.2. Analyse chimique :

### ➤ La Chromatographie en Phase Gazeuse :

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (**Arpino et al., 1995**).

C'est une méthode de séparation dont les principes généraux sont les mêmes que ceux énoncés pour la chromatographie en général, c'est-à-dire fondés sur la migration différentielle des constituants du mélange à analyser au travers d'un substrat choisi (**Tranchant, 1999**).

La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit (**Arpino et al., 1995**).

#### Principe:

En CPG, l'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de l'analyte entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (**Skoog et al., 2003**).

Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) (**Kováts, 1965**) ou en programmation de température (indice de rétention) (**Van Den Dool et Kratz, 1963**).

Ils sont ensuite comparés avec ceux de produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature).

➤ **Spectroscopie de Masse (SM) :**

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet d'identifier et de doser une substance ou un élément chimique. Elle apporte également des informations sur la composition, la structure et la masse moléculaire de l'échantillon.

Enfin, le spectromètre de masse est un outil permettant d'étudier la chimie des ions en phase gazeuse sous ses divers aspects (cinétique, énergétique et mécanistique).

Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée. L'analyse par spectrométrie de masse nécessite par conséquent la formation initiale d'ions, à l'état gazeux, à partir de l'échantillon.

Vue sa capacité à identifier un très grand nombre de composés présents dans le mélange à analyser, elle représente le couplage le plus utilisé dans divers secteurs notamment avec la chromatographie phase gazeuse.

➤ **La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM) :**

L'instrumentation moderne est progressivement confrontée à des analyses de plus en plus complexes, liées au nombre important de constituants présents et aux quantités extrêmement faibles à détecter.

Un exemple classique des milieux complexes présentant ces caractéristiques sont les huiles essentielles dans lesquelles il n'est pas rare de vouloir identifier et quantifier dans le mélange un seul produit présent en traces représentant une partie par milliard de l'échantillon total (**De Maak et Sablier, 1999**).

Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes (**Pradeau et Cohen, 1992**) :

- **Ionisation** : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de départ.
- **Accélération** : les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- **Séparation** : les ions seront distribués suivant leur rapport masse /charge.
- **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.
  
- **Traitement du signal** : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports: masse / charge.

Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles, commerciales ou construites au laboratoire. Les spectres de masse expérimentaux peuvent aussi, si besoin, être comparés à des spectres contenus dans des bibliothèques non informatisées.

L'appareillage CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

➤ **Analyse de l'espace de tête « Head Space » :**

Une cloche de verre est placée sur la fleur sur pied et elle est parcourue par un gaz neutre qui va se charger des molécules odorantes. Ce gaz sera ensuite analysé pour réaliser une carte d'identité moléculaire du parfum de cette fleur (**Laszlo et Rivière, 1997**).

## ➤ La Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13 : (RMN)

L'utilisation de la RMN pour l'identification de molécules connues présentes dans une huile essentielle a été non seulement suggérée mais fortement conseillée (**Grundschober, 1991**).

La résonance magnétique nucléaire est un outil exceptionnel pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou synthétique.

L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de fournir la possibilité d'identifier les connexions entre atomes des diverses entités, squelette, groupes fonctionnels et finalement de permettre de les situer dans l'espace les uns par rapport aux autres (**Platzer, 2002**).

La RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré pour être éventuellement soumis à d'autres analyses.

Les spectres sont réalisés à température ambiante, ce qui évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles.

Enfin, l'étude de produits « lourds » ne pose pas de problèmes particuliers alors que leur faible volatilité rend souvent leur analyse difficile (**Cavalli, 2002**).

## 11. Composition chimique des huiles essentielles :

### 11.1. Les terpènes :

Les terpènes qui appartiennent à la vaste famille des isoprénoïdes constituent la classe la plus large des métabolites secondaires. La majorité des substances de cette classe sont généralement insolubles dans l'eau (**Taiz et Zeiger, 2002**).

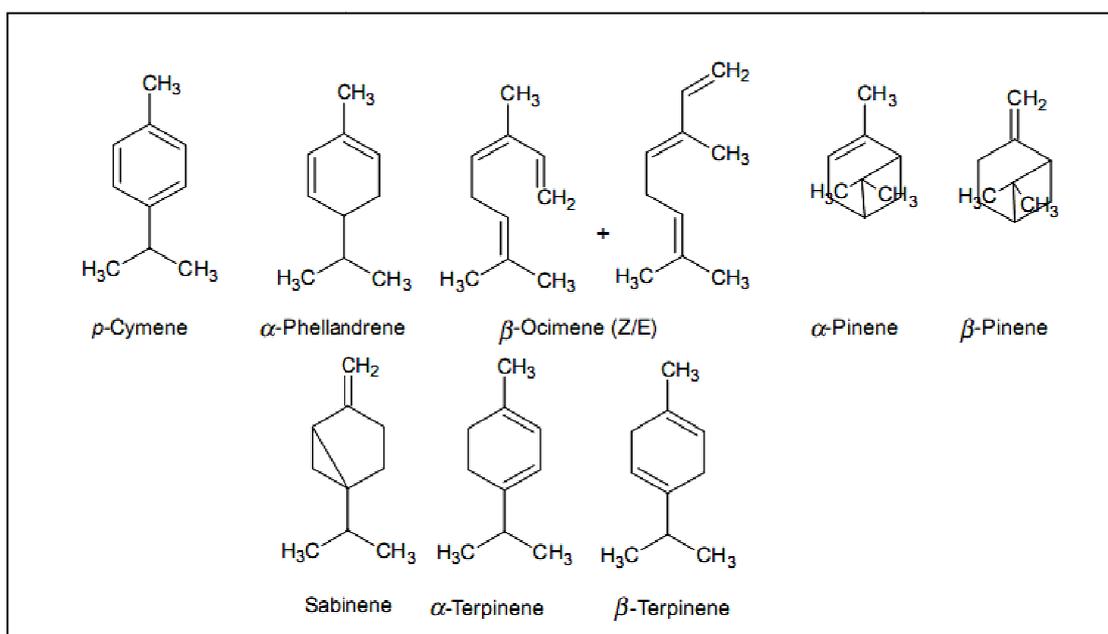
Les isoprénoïdes ont une structure plus ou moins complexe issue de la condensation des molécules à chaînes carbonées linéaires à 5 atomes de carbone qui dérivent de l'isoprène.

Après extraction des huiles essentielles, on rencontre seulement les terpènes les plus volatils dont le poids moléculaire est faible, se sont les monoterpènes et les sesquiterpènes (Guignard, 2000).

▪ **Monoterpènes :**

Ce sont des molécules à 10 atomes de carbone, ils existent sous la forme d'hydrocarbures simples qui peuvent être acycliques (Myrcène, Ocimène), monocycliques ( $\rho$ -Cymène,  $\alpha$ -Terpinène), ou bicycliques (Camphène, Pinène).

A côté des hydrocarbures, on rencontre des dérivés oxygénés divers : des aldéhydes (Linalal, Géraniol..), alcools (Citronellol, Géraniol..) et acides (Acide linalique..) voire des esters (Acétate de linalyle...) (Singh et al., 1989, Kaufman et al., 1999).



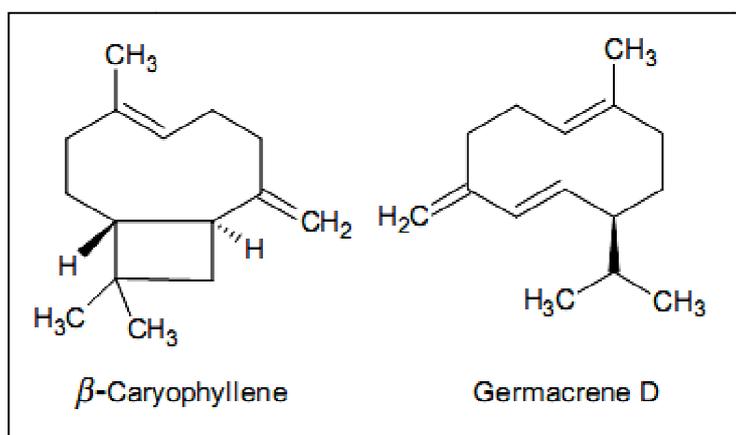
**Figure 4:** Structure de quelques monoterpènes

▪ **Sesquiterpènes :**

Ce sont des molécules à 15 atomes de carbone constituées par trois unités isopréniques, ils forment un sous groupe réparti de la même façon que les monoterpènes (Wink, 2003).

Ils sont abondants dans les essences dont ils constituent parfois une partie considérable, se distinguent des autres terpènes par leur point d'ébullition plus élevé (250 à 280°C), par une densité plus forte  $d > 0,9$  et par un indice de réfraction plus élevé (**Bruneton, 1999**).

Exemples de sesquiterpènes caractéristiques des huiles essentielles : Hydrocarbures ( $\beta$ -bisabolène longifolène..), alcools (carotol, farnesol...) aldéhydes (sinensal..) et d'esters (acétate de cedryle).



**Figure 5:** Exemples de sesquiterpènes entrant dans la composition chimique des huiles essentielles

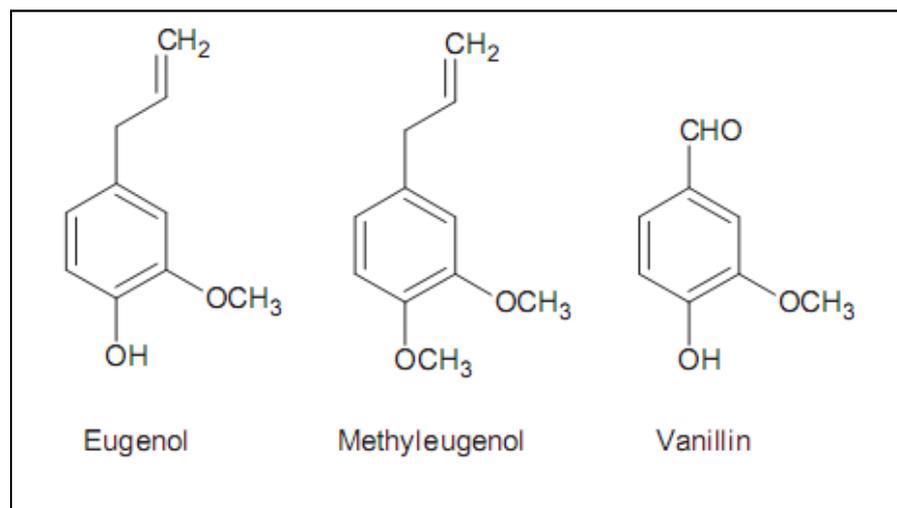
### 11.2. Composés aromatiques :

La plupart des huiles essentielles contiennent une forte teneur en dérivés aromatiques (**Bruneton, 1993**).

Ces composés odorants sont de type phénylpropanoïdes dont la biogénèse est différente de celle des terpènes (**Bernard et al., 1988**).

Les composés aromatiques peuvent être :

- Des aldéhydes (cinnamique, cuminique, anisique).
- Des phénols et éthers (thymol, eugénol, anéthol).
- Des coumarines et des alcools.



**Figure 6:** Structure de quelques dérivés du phénylpropanoïde.

### 11.3. Composés d'origines diverses :

Selon le mode de récupération utilisé, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire entraînés lors de l'hydrodistillation : hydrocarbures (linéaires ou ramifiées, saturées ou insaturées...), acides (C<sub>3</sub> à C<sub>10</sub>), alcools, aldéhydes, esters acycliques et des lactones (Bruneton, 1995).

### 12. Toxicité des huiles essentielles:

Rasooli *et al.*, 2006; ont rapporté les effets anti-listeria de l'huile essentielle de thym.

Les auteurs signalent que des huiles essentielles telles que celles du thym pourraient avoir une application dans la conservation des produits alimentaires où elles seront considérées comme des additifs.

Les huiles essentielles, y compris celles des espèces différentes de thym, ont une composition chimique très variable, dont certains composants ont un effet toxique sur les cellules cutanées des humains et ceci même à de faibles doses.

Le linalol, qui est un composant de l'huile essentielle de thym, s'est avéré toxique pour les cellules cutanées humaines (**Prashar et al., 2004**)

Eugénol, qui est un composant de l'huile essentielle de *Thymus capitatus*, *cilicus*, *funkii*, et *vulgaris*, est un composé hépatotoxique (**James et al., 2005**)

Chez les enfants, une quantité de 10 ml de l'huile essentielle du clou de girofle contenant de l'eugénol a mené à une insuffisance hépatique (**Hartnoll et al., 1993**)

Les autres effets toxiques des huiles essentielles incluent l'irritation de la muqueuse, les vomissements, la diarrhée, les convulsions, l'insuffisance rénale, et la dépression du système nerveux central.

Comme n'importe quel additif, chaque composant devrait être examiné rigoureusement pour vérifier sa toxicité avant qu'il soit autorisé à être mis au contact des produits alimentaires pour la consommation humaine (**Eisenhut, 2007**).

### 13. Utilisations:

- **Pour leurs activités biologiques:**

**Moharramipour et al., 2008** ont signalé l'effet insecticide de l'huile essentielle de *Thymus persicus* L. sur les insectes ravageurs des denrées alimentaires : *Tribolium castaneum* et *Callosobruchus maculatus*.

Les huiles essentielles ont une activité antiseptique pour les poumons (Eucalyptus), dépuratives ou cicatrisantes (Lavande) (**Caillard, 2003**).

Les terpènes ou terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires. En 1977 a été signalé que 60% des dérivés des huiles essentielles examinés jusqu'au 1999 sont inhibiteurs de mycètes tandis que 30% inhibent les bactéries.

Le triterpénoïde, l'acide bétulinique est l'un des terpénoïdes qui ont montré une action inhibitrice envers HIV (**Cowan, 1999**).

- **En parfumerie et produits de beauté :**

Les huiles essentielles sont employées dans le secteur de la cosmétique, notamment pour la fabrication des parfums ; dans les compositions parfumantes des détergents et des produits de parfumerie fonctionnelle ; mais aussi dans le domaine alimentaire. L'utilisation des huiles essentielles pour l'élaboration des parfums est évidente (**Besombes, 2008**).

- **En industrie agroalimentaire:**

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents, elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments (**Turgeon, 2001**). Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Comner, 1993**).

Dans les domaines phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires.

- **En aromathérapies:**

L'homme a perçu les produits naturels comme ayant des propriétés pouvant améliorer la santé humaine et sans danger. Ainsi les huiles essentielles sont utilisées pour leurs effets guérissant, par exemple l'huile essentielle extraite de la baie de genièvre est utilisée pour l'élimination rénale de l'eau et nettoyer la sphère urinaire lors d'infection des voies urinaires.

En usage externe, certaines huiles essentielles (romarin, genièvre, clou de girofle et lavande) sont utilisées sous formes de pommades pour traiter les irritations cutanées notamment lors d'affections rhumatismales, neuralgiques et arthrosiques (**Teuscher et al., 2005**).

## *Chapitre 2 : Les composés phénoliques*

**Introduction:**

Les plantes produisent une grande variété de métabolites secondaires qui contiennent un groupement phénol constitué par un groupe fonctionnel d'hydroxyle sur un noyau aromatique. Ces substances sont classées en tant que composés phénoliques.

Les composés phénoliques de végétaux sont un groupe chimiquement hétérogène constitué d'environ 10.000 composés différents. Il existe parmi eux des composés solubles seulement dans les solvants organiques, certains sont des acides carboxyliques et des glycosides hydrosolubles, et d'autres sont de grands polymères insolubles.

Beaucoup servent de composés de la défense contre des herbivores et des microbes pathogènes. D'autres permettent l'attraction des insectes pollinisateurs, l'absorption du rayonnement ultraviolet nocif, ou la réduction de la croissance des autres plantes voisines de concurrence.

**1. Mécanisme général de la biosynthèse des composés phénoliques :**

La phénylalanine est un intermédiaire dans la biosynthèse de la plupart des composés phénoliques. Les composés phénoliques sont synthétisés par différents processus et constituent ainsi un groupe hétérogène d'un point de vue métabolique.

Deux voies de base sont impliquées: la voie de l'acide shikimique et celle de l'acide malonique.

La voie acide shikimique participe à la biosynthèse de la plupart des composés phénoliques des végétaux.

La voie de l'acide malonique, bien qu'une source importante des produits phénoliques chez les champignons et des bactéries, est d'importance moindre chez les végétaux supérieurs.

La voie de shikimate convertit les précurseurs des sucres simples issus de la glycolyse et la voie du pentose-phosphate en acides aminés aromatiques (**Herrmann et Weaver, 1999**).

Une des intermédiaires de cette voie est un acide shikimique, qui a donné son nom à cet ordre entier des réactions.

La voie acide shikimique est présente dans les végétaux supérieurs, les mycètes, et les bactéries mais absente chez les animaux.

La majorité des composés phénoliques des plantes sont dérivés de la phénylalanine par l'élimination d'une molécule d'ammoniac pour former l'acide cinnamique. Cette réaction est catalysée par la **Phénylalanine Ammonium Lyase** (PAL) qui constitue l'enzyme la plus étudiée dans le métabolisme secondaire des plantes.

Cette enzyme se situe à un point de branchement entre le métabolisme primaire et secondaire, ainsi la réaction qu'elle catalyse est une étape de régulation importante dans la synthèse de plusieurs composés phénoliques.

L'activité de PAL est augmentée par des facteurs environnementaux tels qu'un apport insuffisant en nutriments, la lumière (par son effet sur le phytochrome), et l'infection fongique. Le point de commande semble être le déclenchement de la transcription.

Une infection fongique, par exemple, déclenche la transcription des codes de l'ARN messager codant pour la PAL, ce qui fait augmenter le taux de l'enzyme dans la plante, stimulant ainsi la synthèse des composés phénoliques.

La régulation de l'activité de PAL dans la plante est très complexe, ceci est due à l'existence dans beaucoup d'espèces de multiples gènes de codant pour la PAL, dont certains sont exprimés seulement au niveau de tissus spécifiques seulement dans certaines conditions environnementales (**Logemann et al., 1995**).

Les réactions suivantes catalysées par PAL conduisent à l'addition de plus de groupes d'hydroxyle et d'autres substituants.



Maintenant que les voies biosynthétiques menant à la plupart des composés phénoliques répandus ont été déterminées, les chercheurs ont tourné leur attention à étudier comment ces voies sont régulées.

Dans certains cas, les enzymes spécifiques, telles que PAL, sont importantes dans le contrôle de flux de la voie. Plusieurs facteurs de transcription ont été approuvés pour réguler le métabolisme phénolique en liant la région de promotion de certains gènes de biosynthèse et en déclenchant la transcription (**Jin et Martin, 1999**).

## **2. Classification des composés phénoliques :**

Selon **Harborne (1989)**, les polyphénols peuvent être divisés en au moins 10 classes différentes selon leurs structures chimiques de base. Peuvent s'étendre de molécules simples telles que les acides phénols, aux composés fortement polymérisés tels que les tannins.

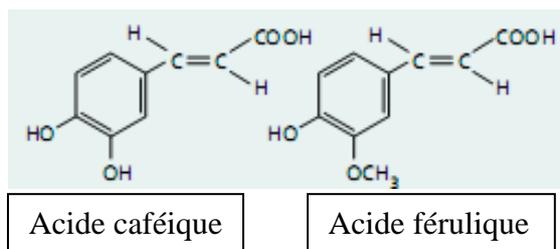
Plusieurs classifications des composés phénoliques basées sur des critères différents ont été proposées.

Selon leur structure chimique, les polyphénols sont divisés en 4 classes majeures: phénols, acides phénoliques, flavonoïdes, tannins (**Anders, 2002**).

### **2.1. Les phénols simples :**

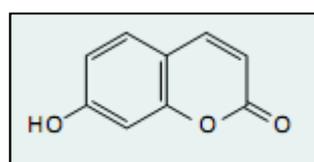
Ils sont largement répandus chez les végétaux vasculaires et semblent remplir plusieurs fonctions. Leurs structures incluent ce qui suit :

**2.1.1. Les phénylpropanoïdes simples:** comme l'acide *trans*-cinnamique, l'acide *p*-coumarique et leurs dérivés, tels que l'acide caféique ayant un squelette de phénylpropanoïde (figure 8).

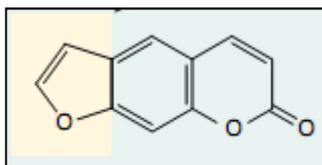


**Figure 8:** Exemples de phénylpropanoïdes simples (Taiz et Zeiger, 2002).

**2.1.2. Les phénylpropanoïdes lactones** (ester cycliques): appelés encore **Coumarines**; ces composés possèdent également un squelette de phénylpropanoïde.



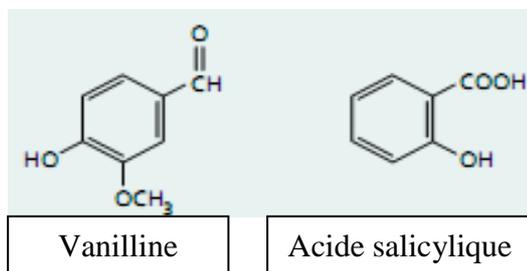
**Umbelliférone:** Coumarine simple



**Psoralen:** Furanocoumarine

**Figure 9:** Exemples de coumarines (Taiz et Zeiger, 2002).

**2.1.3. Les dérivés de l'acide benzoïque :** Ils possèdent un squelette de type C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> qui est formé par le clivage d'un fragment de deux carbones du côté de la chaîne aliphatique.



**Figure 10:** Exemples de dérivés de l'acide benzoïque (Taiz et Zeiger, 2002).

Beaucoup de composés phénoliques simples ont des rôles importants dans la plante comme défenses contre des herbivores les champignons et les insectes.

Les phénylpropanoïdes simples et les dérivés de l'acide benzoïque sont fréquemment dotés d'une activité allélopathique.

Des composés tels que l'acide caféique et l'acide férulique peuvent être libérés dans le sol et inhiber la germination de plusieurs plantes (**Inderjit et al., 1995**).

L'acide salicylique est un régulateur de la croissance des plantes, impliqué dans leur résistance systématique contre les pathogènes.

## **2.2. Tannins :**

Les tannins sont des polyphénols polaires d'origines végétales (**Berthod et al., 1999**), existent presque dans chaque partie de la plante: écorce, bois, feuilles, fruits et racines, leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3000 Daltons (**Cowan, 1999**).

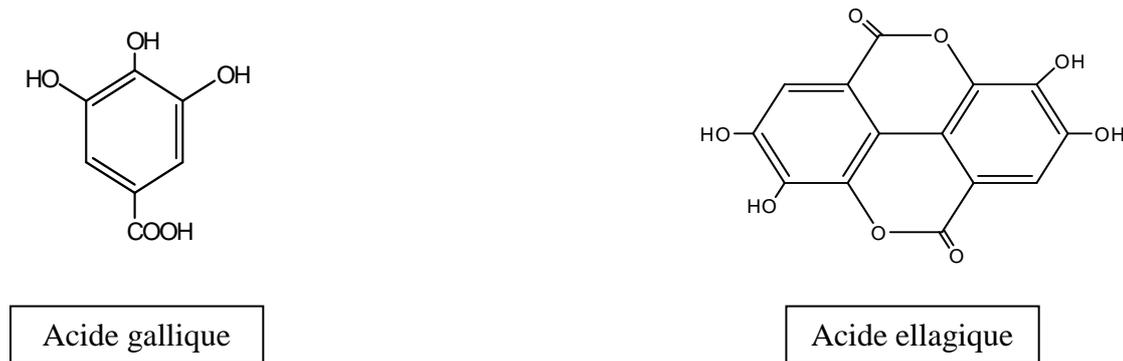
Il est difficile de séparer les tannins d'un extrait végétal, parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire semblable coexistent (**Berthod et al., 1999**). En plus des propriétés classiques des phénols, les tannins peuvent précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines (**Harzfeld et al., 2002**). Les tannins se subdivisent en tannins hydrolysables et condensés (**Ribereau-Gayon, 1968**).

### **➤ Les tannins hydrolysables:**

Les tannins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acide phénols, ou de dérivés d'acides phénols ; la molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides (**Ribereau-Gayon, 1968**).

Ce groupe de tannins est caractéristique des Dicotylédones; on le rencontre notamment chez les rosidées dans tous les organes : racines, tiges, feuilles ou fruits avant la maturité. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements -OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales (**Guignard, 1996**).

Les tannins hydrolysables sont constitués d'un noyau central « le glucose » et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénol. Des liaisons carbone à carbone entre noyaux, conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tannins ellagiques (**Guignard, 1996**).



**Figure 11:** Structures de l'acide gallique et de l'acide ellagique

➤ **Les tanins condensés :**

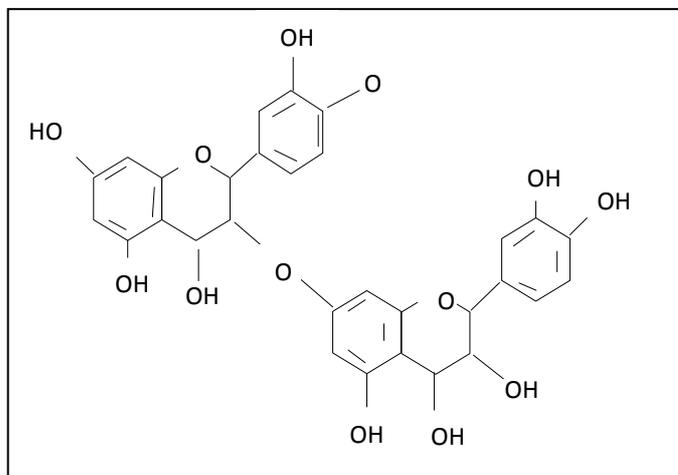
Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidines, sont largement répandus dans l'alimentation humaine (fruits, légumes, thé, dattes, ...).

Ils jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits (**Haslam, 1998**).

Ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides minéraux dilués mais forment à l'ébullition des composés insolubles appelés : rouge de tanins (**Guignard, 1996**).

La structure complexe des tanins condensés est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992**).

Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétrique C2 et C3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. La structure des tannins condensés est illustrée sur la figure 12.

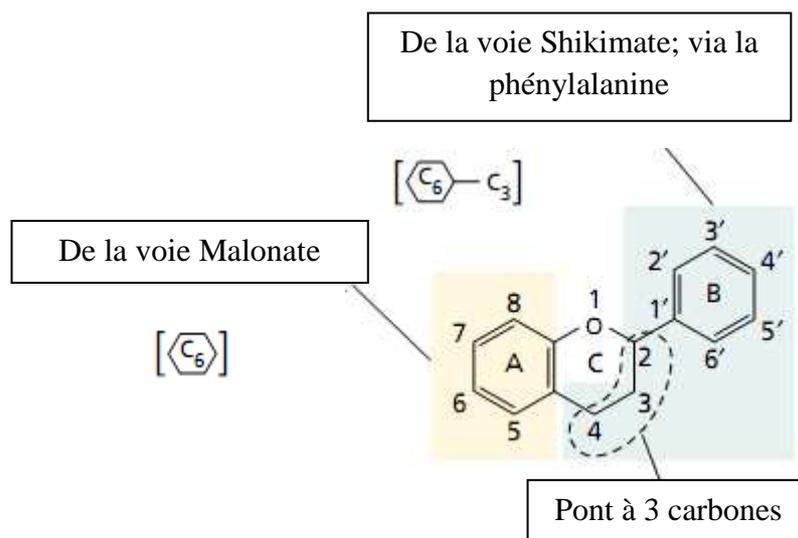


**Figure 12:** Structure de base des tannins condensés (Bruneton, 1987).

### 2.3. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent l'une des classes les plus larges des composés phénoliques. Le squelette des flavonoïdes contient 15 atomes de carbone disposés en deux noyaux aromatiques reliés par un pont à 3 carbones.

Cette structure résulte des deux voies indépendantes de biosynthèse : la voie de l'acide shikimique et celle de l'acide malonique (Figure 13).



**Figure 13:** Structure du squelette de base des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont classés dans différents groupes sur la base du degré d'oxydation de leur pont à trois carbones, ainsi on peut en citer 6 groupes : les anthocyanines, les flavones, les flavonols, les isoflavones, les flavanones et les flavan-3-ols.

Le groupe le plus répandu de flavonoïdes pigmentés est celui des anthocyanines, qui sont responsables de la plupart des couleurs rouge, rose, pourpre, et bleue observées chez les végétaux.

En colorant les fleurs; les anthocyanines permettent d'attirer les animaux de pollinisation et donc jouent un rôle important dans le processus de reproduction des végétaux.

Les anthocyanines sont des glycosides possédant des sucres en position 3. Ainsi, dépourvus de leur sucre, ils prennent le nom d'anthocyanidines.

La couleur des anthocyanines est influencée par plusieurs facteurs, tels que le nombre de groupements hydroxyle et méthoxyle sur le noyau B de l'anthocyanidine, la présence d'acides aromatiques estérifiés sur le squelette principal, et le pH de la vacuole de la cellule au sein de laquelle ces composés sont stockés.

**Tableau 1:** Effet du substituant sur la couleur de l'anthocyanidine.

<b>Anthocyanidine</b>	<b>Substituants</b>	<b>Couleur</b>
<b>Pelargonidine</b>	4'-OH	Orange, rouge
<b>Cyanidine</b>	3'-OH et 4'-OH	Rouge violacé
<b>Delphinidine</b>	3'-OH et 4'-OH et 5'-OH	Pourpre bleuâtre
<b>Peonidine</b>	3'-OCH <sub>3</sub> et 4'-OH	Rouge violacé
<b>Petunidine</b>	3'-OCH <sub>3</sub> et 4'-OH et 5'-OCH <sub>3</sub>	Pourpre bleuâtre

Deux autres groupes majeurs de flavonoïdes rencontrés chez les fleurs sont les flavones et les flavonols. Ces composés absorbent la lumière à des longueurs d'onde plus courtes que celles absorbées par les anthocyanines ce qui les rend invisibles pour l'œil humain (**Taiz et Zeiger, 2002**).

Cependant, les insectes tels que les abeilles, qui voient plus loin dans la gamme ultra-violette du spectre que des humains, peuvent répondre aux flavones et aux flavonols en tant qu'objets d'attraction.

### **3. Utilisation des polyphénols : (Mompon et *al.*, 1998)**

Les polyphénols sont le principe actif de nombreux médicaments : rutoside (flavonoïdes) isolé de plusieurs plantes (eucalyptus, sarrasin, sophora), extrait de méliot tiré en coumarine, podophyllotoxine (lignane) extraite de la raisine du podophylle.

Largement employés dans l'industrie pharmaceutique comme protecteur vasculaire, les oligomères procyanidoliques (OPC) de pépins de raisin sont aussi utilisés en cosmétique pour lutter contre les radicaux libres et les effets du soleil.

Les extraits de romarin ainsi que les tocophérols, co-produits de l'industrie céréalière, ont des propriétés antioxydantes largement utilisés dans l'agro-alimentaire.

L'intérêt majeur des anticyanosides, est leur pouvoir colorant, d'où leur utilisation comme additif alimentaire. A l'heure actuelle, le chou-rouge et les peaux de raisin dominent le marché des matières premières. Comme beaucoup de composés phénoliques, les pigments anthocyaniques se comportent également comme des piègeurs de radicaux libres.

Substances amères, astringentes ou sucrées, les polyphénols sont aussi des aromatisants de choix (tanins de chêne, vanilline...) A titre d'exemple, la vanilline est produite par oxydation de lignine présente dans les liqueurs sulfiteuses résiduelles de la fabrication de la pâte à papier.

Les applications des tanins en tannerie découlent de leur affinité irréversible pour le collagène. Dans les pays industrialisés cet usage a régressé au profit d'autres utilisations : revêtements protecteurs, adhésifs, plastiques, teintures.

#### **4. Toxicité des produits phénoliques:**

La phototoxicité de certains coumarines appelés les furanocoumarines, qui ont un noyau furane attaché est particulièrement intéressante.

Ces composés ne sont toxiques qu'après leur activation sous l'effet de la lumière.

La lumière du soleil dans le domaine Ultraviolet A (320-400 nm), induit l'activation de certains furanocoumarines qui passe à un état excité d'électron à une énergie plus élevée.

Désormais activés, ces furanocoumarines peuvent s'insérer dans la double hélice de l'ADN et se lier aux bases pyrimidiques : la cytosine et la thymine ; ceci bloque la transcription et la réparation de l'ADN et mène par la suite à la mort de cellules.

Psoralen est un furanocoumarine présentant un effet phototoxique contre les insectes herbivores (**Sandberg et Berenbaum, 1989**).

### ***Chapitre3 : Monographie des espèces étudiées***

## 1. La lavande :

### 1.1. Généralités :

Le mot *Lavandula* dérive du latin : lavare, qui signifie : laver (**Chu et Kemper, 2001**).

La lavande a été récoltée par les personnes locales pour des buts cosmétiques et médicinaux tout au long des siècles.

Actuellement, elle est commercialement cultivée autour du monde pour plusieurs utilisations comprenant des buts ornementaux, utilisations culinaires (comme thé ou épice) ou usages de produit de beauté (huile essentielle, parfum). En outre, les abeilles rassemblent le nectar des fleurs de la lavande qui est transformé en miel, une autre activité économique possible (**Sierra et al., 2009**).

Les espèces de *Lavandula* sont d'une grande valeur marchande due à leur arôme plaisant. La matière végétale et son huile essentielle sont principalement utilisées en parfumerie, cosmétique, et industries alimentaires. L'importance médicinale de la plante est bien documentée et les extraits préparées à partir de cette plante sont enregistrés dans beaucoup de pharmacopées (**Sultan et al., 2008**).

Le genre *Lavandula* est un membre important de famille de Labiatae (Lamiaceae) et se compose d'environ 28 espèces, qui sont dans la plupart d'origine méditerranéenne (**Barrett, 1996; Maganga, 2004**).

Les espèces du genre *Lavandula* sont des sous-arbrisseaux aromatiques à inflorescences en épis denses terminaux. Les fleurs sont bractéolées. Le calice est tubuleux à 5 dents courtes inégales et la corolle est exserte à tube dilaté à la gorge, avec 2 lèvres, la supérieure à 2 lobes, l'inférieure à 3. Les étamines sont incluses (**Quezel et Santa, 1963**).

• **Composition chimique :**

Toutes les espèces et les hybrides du genre *Lavandula* sont des plantes fortement aromatiques produisant des mélanges complexes d'huile essentielle dans des glandes situées sur la surface des fleurs et feuilles.

La composition chimique de ces huiles essentielles peut présenter une grande variabilité selon l'espèce et la région.

**Tableau 2:** Teneurs en composés majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces de lavande.

Composés	Teneur en % par rapport à l'huile essentielle		
	<i>L. angustifolia</i>	<i>L. latifolia</i>	( <i>L. latifolia</i> x <i>L. angustifolia</i> )
Acétate linalyl (%)	12-54	19-26	0-1,5
Linalool (%)	10-50	20-23	26-44
Cis et/ou trans Ocimene (%)	1,0-17	1,0-3,0	0-0,3
Lavandulol acétate (%)	0,1-14	0,5-0,8	0,2-1,5
1,8-Cinéol (%)	2,1-3,0	10	25-36
Camphre (%)	0-0,2	12	5,3-14,3
$\alpha$ - et $\beta$ -pinène (%)	0,02-0,3	0,6-0,9	1,6-3,6
Bornéol (%)	1,0-4,0	2,9-3,7	0,8-4,9
Caryophyllène (%)	3,0-8,0	2,7-6,0	0,1-0,3
Myrcène (%)	0,4-1,3	1,2-1,5	0,2-0,4
Farnesène (%)	Traces	1,1	0,2-0,3
Germacrène D (%)	0,2-0,9	1,0-1,2	-
Camphène (%)	0,1-0,2	0,3-0,6	0,2-1,8
Limonène (%)	0,2-0,4	0,9-1,5	1,0-2,2

Source : (Boelens, 1995)

On remarque que les composés majoritaires de l'huile essentielle de *L.angustifolia* sont: **acétate linalyl, linalool, cis-Ocimène et lavandulol**; tandis que pour *L.latifolia* l'huile présente des teneurs élevées en **linalool, linalyl acétate, camphre, borneol et 1,8 Cinéol**.

L'huile essentielle extraite de l'espèce hybride *L. latifolia x L. angustifolia*; possède comme composés majoritaires: 1,8 cinéol, linalool, camphre,  $\alpha$  et  $\beta$ -pinène.

Cette huile essentielle semble donc avoir hérité des caractéristiques principales des deux parents.

### ***Lavandula stoechas* L. 1753**

Le terme Stoechas désigne en grec l'espèce de lavande qui croissait abondamment dans les îles d'Hyères (France), lesquelles avaient reçu pour cette raison le nom d'îles Stoechades (**Beniston, 1984**).

#### **1.2. Classification :**

Nom scientifique : *Lavandula stoechas* L.1753

Nom communs : Lavande stoechas (Français); Spanish, Italian, ou Fringed lavender, (Anglais), Halhal (Arabe).

#### ***Systématique* :**

**Règne** : Plantae

**Embranchement** : Spermatophytes

**Sous embranchement** : Angiospermes

**Classe** : Magnoliopsida

**Ordre** : Lamiales

**Famille** : Lamiaceae

**Genre** : *Lavandula*

**Espèce** : *Lavandula stoechas* L., 1753

### 1.3. Caractères généraux :

*Lavandula stoechas* est un sous-arbrisseau à tige et feuilles persistantes, jusqu'à 1 mètre de longueur, étroit, vert pâle, peuvent s'étendre du gris bleuâtre profond au vert à brun pâle, fleurs de couleur bleu-violet. D'autres variétés sont à fleurs blanche et rose. Le feuillage est gris-vert et aromatique.

L'ensemble de la plante est très aromatique comprenant fleurs et feuilles (**Chu et Kemper, 2001**).

### 1.4. Ecologie :

*Lavandula stoechas* est une plante tendre, qui préfère les endroits ensoleillés et les sols riches, Actuellement, sont cultivés dans le sol calcaire des pays méditerranéens aussi bien que d'autres régions, particulièrement la Bulgarie et les pays de l'ancienne Yougoslavie (**Wiesenfeld, 1999; Chu et Kemper, 2001**).

En Algérie, elle est couramment rencontrée dans les garrigues et les forêts du Tell et du littoral, où elle préfère les formations primitives (silicoles, calcifuge).

L'inflorescence de *Lanvandula stoechas* est illustrée par la figure 14.



**Figure 14:** *Lavandula stoechas* L.1753

### **1.5. Aire botanique :**

De nombreuses espèces de Lavande sont largement distribuées dans la région méditerranéenne et cultivées en France, en Espagne et en Italie.

En Turquie, principalement deux espèces, de *Lavandula stoechas* et *Lavandula angustifolia* et leurs sous-espèces y poussent spontanément ou sont cultivées (**Sultan et al., 2008**).

Largement distribué dans les îles canari, Islande et à travers tout le tell méditerranéen, l’Afrique du Nord, Sud West de l’Asie, Afrique tropicale avec une disjonction vers l’Inde (**Quezel et Santa, 1963; Upson et al., 2000**).

### 1.6. Huile essentielle de *L. stoechas* :

Les autres composés importants sont : terpinéol, 1,8-cinéole et acétate de bornyle.

Il a été signalé aussi que 19 % des composés identifiés étaient des alcools avec 13,48% d'alcools libres.

L'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. renferme comme composés phytochimiques: 1,8-cinéol, fenchone,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène,  $\beta$ -santalène, bornéol, camphre, caryophyllène , géraniol, et le limonène (Esiyok et al., 2004).

**Tableau 3:** Composés majoritaires des huiles essentielles de différentes sous-espèces de *L. stoechas* du Portugal et d'Espagne.

Sous espèces de <i>L. stoechas</i>	Teneur en % par rapport à l'huile essentielle		
	Camphre	1,8-Cinéol	Fenchone
<i>ssp. stoechas</i>	23	-	42
<i>ssp. pedunculata</i>	24	-	20
<i>ssp. sampaiiana</i>	38	-	20
<i>ssp. luisieri</i>	-	22	-

Source : Garcia et al. (1989).

D'après le tableau 3, le camphre est le composé majoritaire des huiles essentielles de trois sous-espèces de *L. stoechas*, mais ces taxons sont caractérisés aussi par une forte concentration en fenchone.

L'huile d'une autre sous-espèce : *L. stoechas ssp. luisieri* provenant du Portugal est chimiquement différente en produisant seulement **1,8 Cinéol** et quelques esters non identifiés comme composés majoritaires.

### 1.7. Composés phénoliques :

En ce qui concerne les flavonoïdes du genre *Lavandula*, peu d'enquêtes ont été entreprises, bien que quelques espèces aient été étudiées.

Les flavonoïdes principaux de *L. stoechas* : apigénine 7-glucoside, lutéoline 7-glucoside et lutéoline 7-glucuronide (**Upson et al., 2000**).

### 1.8. Utilisations :

Elle est utilisée comme expectorant, antispasmodique, carminative, et comme un bon stimulant. L'huile essentielle obtenue à partir des sommités fleuries a été employée comme un remède contre la colique, pour soulager les maux de tête, et pour le nettoyage des blessures (**Gulcin et al., 2004**).

La lavande a été intensivement étudiée phytochimiquement, avec des travaux limités sur des aspects pharmacologiques et est employée par les médecins traditionnels pour différentes maladies du système nerveux central, comme l'épilepsie et la migraine.

Cette plante a été également employée dans la médecine traditionnelle comme un antispasmodique en douleur colique (**Nadkarni, 1982; Usmanghani et al., 1997**).

Elle a des effets analgésique, tranquillisant, antiseptique et antimicrobien. La lavande a également des effets positifs sur la blessure, les infections urinaires, les maladies cardiaques et l'eczéma (**Baytop, 1999**).

La lavande a été employée traditionnellement dans l'épilepsie et comme remède antispasmodique et sédatif (**Gilani et al., 2000**).

La lavande a été montrée pour réduire des taux du sucre dans le sang (**Gamez et al., 1987**).

## 2. Le romarin :

### 2.1. Généralités :

Le mot romarin dérive du latin « Rosmarinus » qui se compose de **Ros** : rose et **Marinus** : marin, donc qui signifie ‘Rose de la mer’.

Le romarin est à la fois une essence aromatique et médicinale, reconnue pour ses vertus antiseptiques, toniques-stimulantes, anti-inflammatoires, cholagogues et antispasmodiques (**Campanili, 1998; Flamini et al., 2002; Fiorenzuoli, 2000**).

Cette plante était déjà connue à l’époque romaine pour ses vertus et a été progressivement introduite vers le centre de l’Europe.

Au début du 16<sup>ème</sup> siècle, Isabelle de Hongrie a eu l’idée de macérer la plante dans de l’alcool pour soigner ses rhumatismes.

Originaire du bassin méditerranéen, le romarin pousse à l’état sauvage dans les îles et les régions côtières (Sud et Centre de l’Italie, Sud de la France, Dalmatie, Sud et Est de l’Espagne, Portugal, Nord du Maroc, Nord de la Tunisie et Grèce), constituant l’une des essences typiques des garrigues (**Scartezzini, 2001**).

Le genre *Rosmarinus* ne comprend que trois espèces:

- *R. officinalis* Linné, de loin l’espèce la plus importante et connue ;
- *R. eriocalyx* Jord. & Fourr.
- *R. tomentosus* Huber-Morath et Maire, morphologiquement très proche de *R. eriocalyx* et, comme ce dernier, moins aromatique que *R. officinalis* (**Bärtels, 1997**).

Le romarin est une plante pérenne à feuilles persistantes, il est caractérisé par une ramification importante de type prostrée-ascendante. Il peut ainsi atteindre une

hauteur de 2 m et une largeur de 1 à 4 m selon la variété botanique et les conditions climatiques et environnementales (**Bown et Hawthorne, 1997; Roccabruna, 2003**).

Les romarins sont des arbustes ou sous-arbrisseaux ligneux très odorants. Leurs feuilles sont linéaires à marge révoluée, gaufrées, verdâtres en dessus plus ou moins hispides blanchâtres en dessous. Le calice est en cloche, bilabié. La corolle est de couleur bleue pâle ou blanchâtre à 2 lèvres, la supérieure entière ou à peine émarginée pas plus longue que l'inférieure, cette dernière est trilobée (**Quezel et Santa, 1963**).

#### •Huile essentielle :

Ses principaux constituants sont généralement: 1,8-cinéole (entre 3 et 60%), l' $\alpha$ -pinène (1 à 57%), du camphre (1 à 57%), du bornéol (1 à 18%), de l'acétate de bornyl (1 à 21%), de la verbénone (0 à 28%), du p-cymène (0,5-10%) ou du myrcène (0,5 à 12%). Ces teneurs peuvent varier en fonction du chémotype de l'huile essentielle.

D'autres composés peuvent également être rencontrés :  $\beta$ -caryophyllène, limonène, linalool,  $\beta$ -pinène, sabinène,  $\gamma$ -terpinène,  $\alpha$ -terpinéol et terpinéol-4 (**Teuscher et al., 2005**).

#### •Composés phénoliques :

(**Ibañez et al., 2003; Ramirez et al., 2004**) ont montré que l'acide vanillique, l'acide caféique, et l'acide p-coumarique constituent les principaux acides phénoliques du romarin.

Certains auteurs ont montré la présence de composés appartenant à la famille des flavonoïdes: genkwanine, cirsimaritrine (**Ibañez et al., 2000; Cavero et al., 2005**), ériocitrine, hespéridine, diosmine, lutéoline (**Okamura et al., 1994; Del Baño et al., 2004**), apigénine (**Yang et al., 2008**).

**•Utilisations :**

- Effets sur le système nerveux : L'administration d'huile de romarin, à la fois par inhalation et par voie orale, stimule l'activité du système nerveux central, respiratoire et locomotrice chez la souris (**Kovar et al., 1987**).
- D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse (**Offord et al., 1995**).
- Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) (**Aruoma et al., 1996**) ; alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1 (**Paris et al., 1993**).
- **Özcan et Akgül (1995)** ont signalé la forte activité antioxydante de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L., par rapport à celle d'un antioxydant commercial (BHA), et ont trouvé que cette huile a montré un fort pouvoir d'inhibition de l'oxydation des lipides.

***Rosmarinus eriocalyx* JORD. & FOURR.**

**2.2. Classification :**

**Nom scientifique:** *Rosmarinus eriocalyx* JORD. & FOURR.

**Nom communs:** Romarin (Français), Rosemary (Anglais), Iklil (Arabe).

**Systématique :**

- **Règne :** Plantae
- **Embranchement :** Spermatophytes
- **Sous embranchement :** Angiospermes
- **Classe :** Magnoliopsida
- **Ordre :** Lamiales
- **Famille :** Lamiaceae
- **Genre :** Rosmarinus
- **Espèce :** *Rosmarinus eriocalyx* JORD. & FOURR.

Cette espèce de romarin est synonyme de *Rosmarinus tournefortii* de Noé.

**2.3. Caractères botaniques :**

C'est une plante rarement trouvée en Espagne, mais qui pousse dans la région d'Almería et dans l'Afrique du Nord, différenciée de *R. officinalis* par son calice velu.

Étroitement liée à *Rosmarinus tomentosus*, c'est une espèce endémique des falaises de mer à formation de pierres à chaux riches en magnésium dans la province de Grenade, Espagne (**Upson, 1992**).

Ce romarin, essentiellement distribué en Afrique du Nord, mais que l'on rencontre dans une zone localisée du Sud-Est de l'Espagne (province d'Almería), se distingue du *R. officinalis* L. par des feuilles plus courtes (jusqu'à 1,5 cm de longueur), à dents légèrement marquées, et des calices et pédoncules floraux couverts de longs poils glandulaires (coexistant avec des poils plus courts étoilés).

L'inflorescence et calice sont à pilosité double, l'une courte, l'autre constituée par de longs poils dressés glanduleux au sommet. Inflorescences longues, à bractées amples cordiformes longues de 3-4 mm (Quezel et Santa, 1963).

La figure 15 montre l'inflorescence de *R. eriocalyx*:



**Figure 15:** *Rosmarinus eriocalyx* JORD. & FOURR

#### **2.4. Ecologie :**

Elle forme un type distinct de végétation avec *Stipa tenacissima* couvrant de grandes surfaces de terre. Elle pousse également plus sporadiquement sur des roches presque pures de gypse où le manque de végétation concurrente lui permet de former un arbuste voûté extrêmement attrayant (Upson, 1992).

### **3. Etude bioécologique de *Callosobruchus maculatus* :**

#### **Introduction :**

La bruche du niébé (*Callosobruchus maculatus* F.), est considéré comme l'un des ravageurs les plus redoutables des graines de légumineuses. Ce coléoptère attaque les graines seines en champs ou entreposées et commet des dégâts particulièrement graves.

Malgré que ce ravageur a été contrôlé en par le moyen des insecticides chimiques, des populations résistantes à ce type de lutte apparaissent chaque année.

Ceci suscite la recherche de nouveaux produits pouvant limiter l'infestation et minimiser les pertes occasionné par cet insecte.

#### **3.1. Caractères généraux de la famille des bruchidae :**

La famille Bruchidae appartient à l'ordre des coléoptères, un grand nombre d'espèces appartenant à cette famille sont des déprédateurs majeurs des stocks de légumineuses (Nyamador, 2009).

Environ 30 espèces des bruches dans le monde sont des ravageurs redoutables, et au moins 9 sont devenus cosmopolites suites aux échanges commerciaux (Kingsolver, 2004).

Les bruches sont des coléoptères de petite taille (4 mm en moyenne, mais certaines espèces peuvent atteindre 25 mm), au corps généralement trapu et de couleurs ternes (à dominante brunâtre).

A l'instar des autres Coléoptères Phytophaga, seuls les 3 premiers articles et le dernier article des tarses (les tarsomères) sont apparents.

Ils se différencient des autres Chrysomeloidea par leur tête allongée en museau, et bien dégagée du prothorax, ainsi que par la contiguïté des procoxas.

En vue dorsale, la tête est cachée par la partie dorsale du prothorax, le pronotum. Les deux élytres recouvrent le ptérothorax, à l'exception d'un petit écusson de forme rectangulaire ou triangulaire, le scutellum. Les élytres recouvrent également tous les tergites abdominaux à l'exception du dernier, le pygidium.

Les larves de bruche s'alimentent entièrement des graines, faisant de leur détection et de contrôle des tâches difficiles (**Daly et al., 1998**).

### **3.2. Systématique :**

**Embranchement :** Arthropoda

**Classe :** Insecta

**Ordre :** Coleoptera

**Sous-ordre :** Phytophaga

**Superfamille :** Phytophagoidea

**Famille :** Bruchidae

**Genre :** *Callosobruchus*

**Espèce :** *Callosobruchus maculatus* (**Fabricius, 1775**).

### **3.3. Répartition géographique :**

L'espèce *C. maculatus* est cosmopolite, mais **Southgate (1978)** considère que c'est une espèce originaire du continent africain; les échanges commerciaux seraient à l'origine de sa distribution actuelle.

Elle est surtout abondante en Amérique mais également sur tout le pourtour du Bassin méditerranéen, dans l'Ouest africain, à Madagascar, en Chine, au Japon et à Hawaï (**Lepesme, 1944**).

### 3.4. Description des stades évolutifs de *C. maculatus* :

**-L'œuf :** Les femelles déposent généralement leurs œufs directement sur les gousses ou les graines. Cette ponte se fait de façon très spécifique, mais il arrive que les femelles se trompent de plantes-hôtes (**Delobel et al., 2000**).

L'œuf de *C. maculatus* est asymétrique, arrondi à la base, subsonique à l'extrémité. Il mesure de 0,4 à 0,7 mm de long sur 0,3 à 0,4 mm de large. Lorsque la femelle le dépose sur la surface du haricot, il s'aplatit légèrement sur ce substratum auquel il adhère grâce à un liquide expulsé par la femelle en même temps que l'œuf.

#### **-Les larves :**

En effet, les larves de ces insectes sont cléthrophages et se développent en général au sein d'une seule et même graine (**Johnson, 1981 ; Delobel et Tran, 1993**).

La larve néonate qui émerge de l'œuf se distingue alors des autres stades larvaires par des structures particulières qui l'aident à sortir de l'œuf (**Johnson, 1981, 1988; Johnson et Siemens, 1991 ; Delobel et Tran, 1993 ; Daly et al., 1998**). Elle est en outre très mobile, et elle peut percer des téguments très épais et durs de façon à pénétrer dans les graines.

Peu de temps après être entrée dans la graine, la larve du premier stade (L1) mue. Les stades larvaires suivants sont apodes et se développent dans la graine. La situation inverse existe et parfois plusieurs larves de la même espèce peuvent se développer dans une même graine.

En général, le dernier stade larvaire se nymphose à l'intérieur de la graine consommée (après avoir préparé un orifice de sortie) (**Delobel & Tran, 1993**).

**-La nymphe :**

Comme chez tous les holomètes, des transformations importantes vont s'opérer pendant la nymphose. Grâce à des sécrétions blanchâtres provenant des tubes de Malpighi, les organes se sclérifient dans l'ordre suivant : les yeux d'abord, les pièces buccales et les antennes, les pattes, les élytres puis le corps tout entier (**Ouedraogo, 1978**).

**-L'imago :**

L'imago émerge de la graine en découpant la membrane tégumentaire à l'aide de ses mandibules. C'est un adulte qui s'accouple dans les minutes qui suivent son émergence s'il est de la forme non voilière. Dans le cas des imagos de la forme voilière, les organes génitaux sont immatures et on n'observe aucun accouplement dans les 4 ou 5 jours suivant l'émergence.

Dans tous les cas, l'âge de l'insecte est déterminé à partir de l'instant où il émerge de la graine et mène une vie libre (**Ouedraogo, 1978**).

Les adultes mesurent de 2,8 à 3,5 mm de long, ayant un corps trapu de coloration rougeâtre. Les élytres présentent quatre taches foncées bordées de soie, ces taches peuvent faire complètement défaut ou se réduire à une simple bordure latérale sur les élytres.

Les antennes sont noires avec quatre premiers articles roux, chez le mâle elles sont plus élargies à partir du 7<sup>ème</sup> article, mais certaines femelles ont les antennes entièrement rouges (**Hoffman, 1945 ; Balashowsky, 1962**).

Les pattes postérieures sont plus longues que les deux autres paires, elles portent des épines dont le nombre et la disposition permettent de différencier la bruche du pois chiche de celle du haricot (**Utida, 1981**).

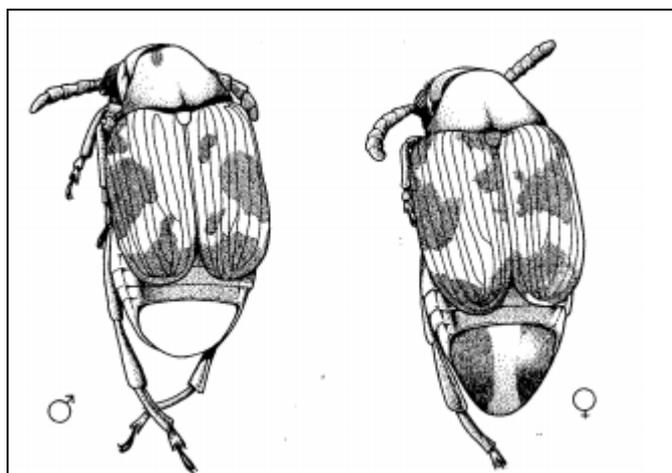
Le pygidium est de couleur blanche parsemé de deux grandes taches noires rouges plus ou moins brunâtres (**Lepesme, 1944**).

### 3.5. Distinction des sexes :

Les mâles et les femelles sont facilement distingués les uns des autres par aspect général. La caractéristique de distinction est la coloration du plat couvrant l'extrémité de l'abdomen.

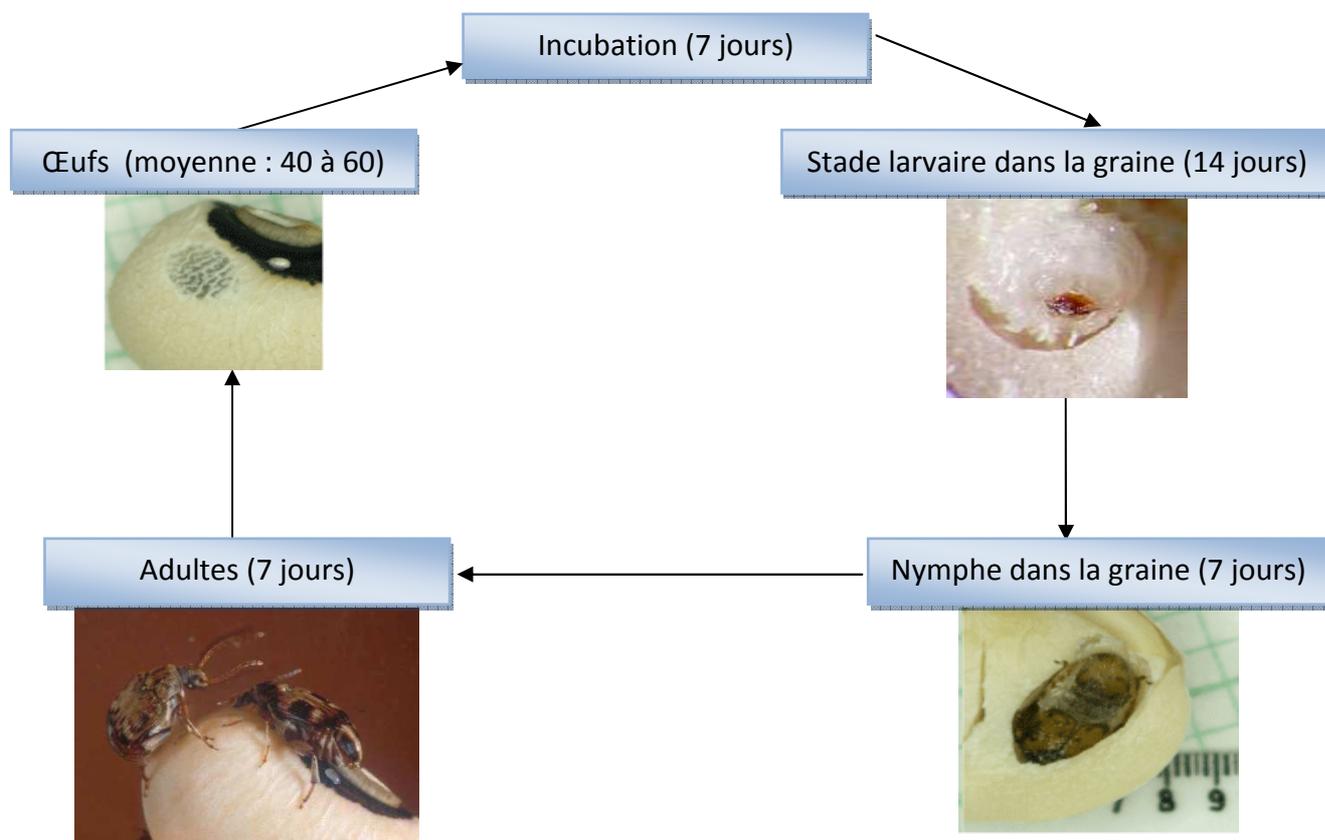
Chez la femelle, le plat est agrandi et est obscurément coloré des deux côtés. Chez le mâle, le plat est plus petit et manque des raies. En général, les femelles sont plus grandes dans la taille que des mâles (**Beck et Blumer, 2011**).

En outre les macules (taches) sont très réduites chez le mâle ou peuvent faire carrément défaut, leur conférant une couleur plus rougeâtre par rapport aux femelles (**Lepesme, 1944**).



**Figure 16:** Schéma d'une vue dorsale du mâle et de femelle de *C. maculatus* (**Brown et Downhower, 1988**).

### 3.6. Cycle biologique:



**Figure 17:** Cycle biologique de *C. maculatus* en conditions optimales (Laurie et Ntoukma, 2002).

Une fois inséminées, les femelles adultes déposent les œufs fertilisés sur la surface externe de la graine. Les œufs (0,75 mm de long) sont ovales ou axe formés, clairs, brillants et fermement collé sur la surface de la graine.

Après éclosion, la larve pénètre à l'intérieur de l'endosperme. Une fois que la larve creuse dans le pois chiche l'œuf restant (coquille) devient blanc opaque pendant qu'il se remplit de déchets de la larve.

La larve creuse et s'alimente sur l'endosperme et l'embryon du grain, subit une série de mues, et creuse dans une position juste sous l'écale du grain avant la nymphose. Bien que la graine soit encore intacte, une fenêtre ronde de 1-2 mm apparaît à l'endroit où se déroule la nymphose (**Beck et Blumer, 2011**).

La nymphose représente le stade de développement intermédiaire entre la larve et l'imago, ce dernier émerge de la graine en découpant la membrane tégumentaire à l'aide de ses mandibules (**Ouedraogo, 1987**).

Les adultes sont entièrement mûrs 24 à 36 heures après apparition. Les mâles vont rechercher des femelles à inséminer; ces dernières femelles stockent le sperme viable dans leur spermathèque (une structure dans la région reproductrice femelle pour stocker le sperme).

Les adultes mâles et femelles s'alimentent peu ou pas du tout pendant leur vie courte (10-14 jours) (**Beck et Blumer, 2011**).

*Callosobruchus maculatus* est une espèce de coloration variable, ce qui peut conduire une confusion avec d'autres espèces du même genre. Une partie de cette variabilité est due à la présence de deux formes chez les adultes, qui diffèrent non seulement dans leurs morphologies mais au niveau physiologique (**Utida, 1981**).

**Utida (1954)**, les a baptisées forme non voilière, et forme voilière selon la présence ou l'absence d'aptitude au vol.

### 3.7. Dégâts occasionnés par *C. maculatus* :

Malgré que la ponte peut avoir lieu sur d'autres espèces de légumineuses comme le haricot (*Phaseolus vulgaris*), la fève (*Vicia faba*), le petit pois (*Pisum sativum*); *Callosobruchus maculatus* ne se développe que sur le niébé (*Vigna unguiculata* Walp.), ou le pois chiche (*Cicer arietinum*).

Sur ces denrées alimentaires, cette espèce produit seize générations en un an lorsque les graines sont disponibles (**Ketoh et Glitho, 2006**) et occasionne des pertes estimées entre 800-900 g/kg dans les différentes zones en Afrique (**Ouedraogo et al., 1996; Glitho et Nuto, 1987**), mais c'est en Afrique du Nord et en Amérique centrale que l'ampleur des dégâts est considérable (**Fleurat Lessard, 1980**).

D'autre part, d'autres pertes en éléments nutritifs peuvent être occasionnées: une diminution de la teneur en thiamine, une augmentation de l'acidité des gousses et une dénaturation des protéines (**Southgate, 1978**)

### 3.8. Ennemies naturels:

De nombreux prédateurs et parasites de *C. maculatus* ont été identifiés ce qui peut constituer une autre alternative pour limiter les dégâts causées par cet insecte.

Le tableau 4 regroupe quelques ennemis naturels de *C. maculatus*:

**Tableau 4:** Ennemis naturels de *C. maculatus*.

<b>Famille</b>	<b>Espèces</b>	<b>Auteurs</b>
<b>Trichogrammatidae</b>	<i>Uscana lariophaga</i> Steff	<b>Monge et al., (1990)</b>
	<i>Uscana semifumipennis</i> Girault	<b>Van Huis (1991)</b>
	<i>Uscana muckerju</i> Mani	<b>Kapila et Agarwal (1990)</b>
<b>Eupelmidae</b>	<i>Eupelmus orientalis</i> Crawf	<b>Van Huis (1991)</b>
	<i>Eupelmus vuilleti</i> Crawf	<b>Monge et al., (1990)</b>
<b>Pteromalidae</b>	<i>Anisopteromalus calandrae</i> How	<b>Heong (1981)</b>
	<i>Chaetospila elegans</i> Westwood	<b>Van Huis (1991)</b>
	<i>Dinarmus basalis</i> Rondani	<b>Rojas-Rousse et al., (1988)</b>
	<i>Dinarmus vagabundus</i> Timberleke	<b>Van Huis (1991)</b>
	<i>Lariophaga texacus</i> Crawf	
<b>Eurytomidae</b>	<i>Eurytoma</i> sp.	<b>Prevelt (1961)</b>

### 3.9. Méthodes de lutte contre les ravageurs des denrées stockées :

Si l'infestation des graines n'est pas maîtrisée, ceci peut entraîner de lourdes pertes en quantité mais aussi en qualité du produit.

### 3.9.1. Lutte chimique:

- **Insecticides de contact:**

Ce sont des produits pénétrant les tissus de l'insecte après avoir traversé la cuticule.

Les familles d'insecticides les plus utilisées dans les zones de culture du niébé sont les organophosphorés et les organochlorés suivis par les pyréthrinoïdes et les carbamates (Ngamo, 2004).

Parmi organochlorés, le lindane semble être le plus efficace contre *C. maculatus* avec une  $DL_{50}$  de **0,01 $\mu$ g/adulte**.

- **Les fumigants :**

Les fumigants sont des insecticides à haute tension de vapeur qui agissent sous forme gazeuse. Ces composés très toxiques pour l'homme et les animaux sont soumis lors de leur application à des normes de sécurité très strictes. Par rapport aux insecticides de contact, ils possèdent l'avantage de ne laisser aucun résidu sur les denrées.

La fumigation est un traitement purement curatif. Une fois réalisée, le stock n'est plus protégé contre de nouvelles infestations.

Dans les pays chauds, la phosphine ( $PH_3$ ) est le fumigant le plus couramment utilisé (Howe, 1978; Hindmarsh et al., 1978) et s'avère très efficace contre les œufs et les larves de *C. maculatus* (Singh et al., 1990).

### 3.9.2. Lutte physique :

- **Irradiation gamma :**

Son principe repose sur l'exposition des populations d'insectes, soit à des doses élevées d'irradiation pour tuer tous les stades de développement de l'insecte, soit à des doses plus faibles pour les stériliser

L'éclosion des œufs a été inhibée à 10 Gy, tandis qu'une dose de 20 Gy a été suffisante pour arrêter le développement de tous les stades larvaires de *Callosobruchus maculatus*.

L'exposition à une dose de 150 Gy, a réduit le pourcentage d'émergence des adultes à 50%. D'une autre part, la longévité des adultes a été significativement affectée à une dose de 500 Gy et n'a pas dépassé les 3 jours (**Elbadry et Ahmed, 1975; Hekal et El-Kady, 1987**).

- **Atmosphère contrôlée :**

Il a été démontré que l'enrichissement de l'atmosphère par l'azote (N<sub>2</sub>) ou par le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) fait chuter la teneur en oxygène et ainsi l'asphyxie de l'insecte.

### **3.9.3. Lutte biologique:**

La lutte biologique constitue de nos jours la stratégie sur laquelle se focalisent les attentions des institutions de recherche.

Pour la gestion des bruches, les études ont montré que les espèces *Uscana lariophaga* et *Dinarmus basalis* respectivement parasitoïde oophage et larvophage de *Callosobruchus maculatus* constituent de potentiels candidats pour une lutte biologique (**Thomas-Odjo et Gaspar, 1994; Ouedraogo et al., 1996**).

### **3.9.4. Phytopesticides:**

L'utilisation des produits chimiques dans la lutte contre les ravageurs des produits agro-alimentaires constitue un moyen efficace pour palier à ce problème. Toutefois, ces substances peuvent avoir un effet néfaste sur la santé de l'homme, ceci incite à chercher d'autres modes d'actions qui ne présentent pas de risque sur notre bien-être.

Les huiles essentielles des végétaux semblent être une piste prometteuse dans ce domaine de recherche vu leurs fortes activités insecticide et leur caractère naturel non toxique.

Ce sont des produits issus des végétaux et qui ne laisse pas de résidus et ne présentent aucun risque sanitaire pour le consommateur. Les plantes les plus efficaces dans la protection des denrées au cours du stockage appartiennent aux familles des Meliaceae, Annonaceae, Labiatae, Rutaceae, Asteraceae, Canellaaceae (**Jacobson, 1989**).

L'utilisation des extraits végétaux et des huiles essentielles pourrait réduire les dégâts causés par les différents ravageurs.

### **3.10. Effet des huiles essentielles:**

Les huiles essentielles ont des effets anti-appétants, affectant ainsi la croissance, la mue, la fécondité et le développement des insectes et acariens.

Il y a eu également inhibition complète de la pénétration des larves dans les graines traitées de linalool et de thymol. De plus, ce dernier produit s'est avéré inhibiteur de l'émergence des adultes (**Regnault-Roger et Hamraoui, 1995**).

#### **3.10.1. Effets sur l'octopamine:**

L'octopamine est un neuromodulateur spécifique des invertébrés: cette molécule a un effet régulateur sur les battements de cœur, la motricité, la ventilation, le vol et le métabolisme des invertébrés.

**Enan (2000) et Isman (2000)** font le lien entre l'application de l'eugénol, de l'alpha-terpinéol et de l'alcool cinnamique, et le blocage des sites accepteurs de l'octopamine. Il conclut que l'effet peut varier d'un terpène à l'autre et que les huiles essentielles peuvent agir en tant qu'agonistes ou antagonistes du neuro-transmetteur.

En général, les huiles essentielles sont connues comme des neurotoxiques à effets aigus interférant avec les transmetteurs octopaminergiques des arthropodes.. Ces huiles sont donc peu toxiques pour les animaux à sang chaud.

### 3.10.2. Sur le système nerveux :

Les huiles essentielles sont riches en monoterpènes et cause la mort des insectes par inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau du système nerveux (Houghton et al., 2006).

### 3.10.3. Effets physiques :

Les huiles essentielles agissent directement sur la cuticule des arthropodes à corps mou. Isman (2000) fait cette hypothèse car plusieurs huiles essentielles semblent plus efficaces sur les arthropodes à corps mou.

La nature lipophile de l'huile essentielle peut dégrader la couche cireuse de la cuticule et causer des pertes en eau. Les trachées et les sacs d'air des insectes sont enduits de cette couche cireuse et sont affectées par l'huile essentielle ce qui peut entraîner l'asphyxie.

D'autres travaux ont démontré que l'huile essentielle de *Thymus persicus* possède un effet répulsif et toxique vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus* et *Tribolium castaneum*. Les doses létales à 50% de cette huile contre les deux ravageurs étaient de 2,39  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  et 234,42  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  respectivement (Moharramipour et al., 2008).

Suthisut et al., (2011), les huiles essentielles de trois plantes de la famille de Zingiberaceae ont montré une forte activité toxique contre *Tribolium castaneum*, *Sitophilus zeamais*.

D'une autre part, les composés majoritaires de ces huiles ont été testés et ont manifesté un effet toxique comparable.

Deux lepidoptères (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller et *Ephestia kuehniella* Zeller), sont avérées très sensibles aux traitements avec de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*.

Les auteurs ont aussi détecté une réduction de la fécondité et du taux d'émergence des ravageurs (Bachrouch et al., 2010).

## *Chapitre 4 : Oxydation et antioxydants*

## **Introduction :**

Ces dernières années, l'intérêt de la recherche du rôle des antioxydants dérivés des plantes dans la nourriture et la santé humaine a augmenté. Cependant, d'autres champs ont besoin également des antioxydants, comme dans la commande de polymérisation dans la fabrication du caoutchouc, des plastiques et de la peinture et pour la protection des plastiques clairs contre la lumière UV, ou dans la conception de meilleurs carburants d'automobile et des huiles de graissage (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

Par conséquent, l'application pratique des antioxydants s'est développée pour être si large qu'il est difficile de trouver une définition appropriée pour le terme antioxydant lui-même.

## **Généralités sur le phénomène d'oxydation des lipides :**

### **1. Substrats lipidiques :**

Les acides gras libres ou estérifiés sous forme de glycérides sont sensibles à l'oxydation. Libres, les acides gras s'oxydent plus rapidement que les triglycérides montrant l'importance de la lipolyse dans le déroulement des phénomènes d'oxydation.

Ainsi, les huiles riches en acides gras polyinsaturés telles que celles de poissons sont très sensibles à l'oxydation (**Croguennec et al., 2006**).

### **2. Phénomène d'oxydation des lipides :**

L'oxydation des lipides peut s'effectuer suivant différents mécanismes. Cependant les compositions des produits de la réaction sont quasiment les mêmes et indépendantes du mécanisme (**Pokorny, 2003**).

Le tableau 5 résume les principaux mécanismes d'oxydation des lipides :

**Tableau 5:** Mécanisme d'oxydation des lipides (Pokorny, 2003).

Type d'oxydation	Lipides oxydés	Catalyseur	Agent oxydant	Prévention
Auto-oxydation	Tous les lipides insaturés	Métaux lourds, radicaux libres	Oxygène triplet	Antioxydants
Oxydation enzymatique	Lipides ployinsaturés	Lipoxygénases	Oxygène triplet	Inactivation des enzymes
Oxydation due à l'oxygène singulet	Tous les lipides insaturés	Molécules photosensibles	Oxygène singulet	Piégeage d'oxygène singulet

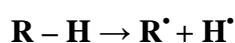
## 2.1. Mécanisme d'auto-oxydation des lipides :

L'auto-oxydation des lipides est une réaction radicalaire en chaîne autocatalytique. Une séquence impliquant une étape d'initiation correspondant à l'activation de la molécule d'acide gras, une phase de propagation et des réactions de terminaison ont été proposées pour expliquer l'auto-oxydation des lipides (Croguennec et al., 2006).

Etant une réaction des radicaux libres, l'auto-oxydation se procède en 3 étapes :

**2.1.1. Phase d'initiation:** c'est la première étape durant laquelle des radicaux libres sont formés à partir des molécules lipidiques par arrachement d'un atome d'hydrogène d'une chaîne d'acides gras généralement non saturés.

La réaction principale de la phase d'initiation est la suivante :



**Figure 18:** Phase d'initiation

D'après **Croguennec et al. (2006)**, l'oxydation des lipides est d'abord très lente du fait de la faible vitesse d'initiation. En effet, le départ de l'atome d'hydrogène est peu probable en raison de l'énergie d'activation élevée de la réaction. Il est cependant facilité par :

- Le chauffage (thermolyse).
- La lumière (photolyse).
- Les radiations ionisantes.
- La présence d'ions métalliques polyvalents, libres ou liés à des molécules organiques
- Certaines enzymes (lipoxygénase).

### **2.1.2. Phase de propagation :**

Après l'initiation, les réactions de propagation se déclenchent durant lesquelles un radical libre est converti en un radical d'acide gras différent.

Ces réactions entraînent l'arrachement d'un ion d'hydrogène ou l'addition de l'oxygène sur un radical alkylique.

L'enthalpie d'activation de la réaction de propagation est relativement plus faible que celle de l'initiation, ce qui explique sa vitesse plus élevée (**Pokorny et al., 2000**).

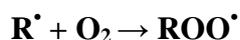
La réaction d'un radical acide gras avec une molécule d'oxygène est très rapide lorsque la teneur en oxygène n'est pas limitante.

Lors de la phase de propagation un seul radical libre peut initier la formation de nombreuses molécules d'hydroperoxydes (1000 ou plus par minute).

La quantité d'hydroperoxydes générée correspond à la quantité d'oxygène consommée lors de l'oxydation des chaînes d'acide gras.

La vitesse de formation des hydroperoxydes s'accélère au cours du temps (**Croguennec et al., 2006**).

Les réactions la phase de propagation sont les suivantes sont représentées dans la figure 19:



**Figure 19:** Phase de propagation

**• Formation des produits secondaires d'oxydation :**

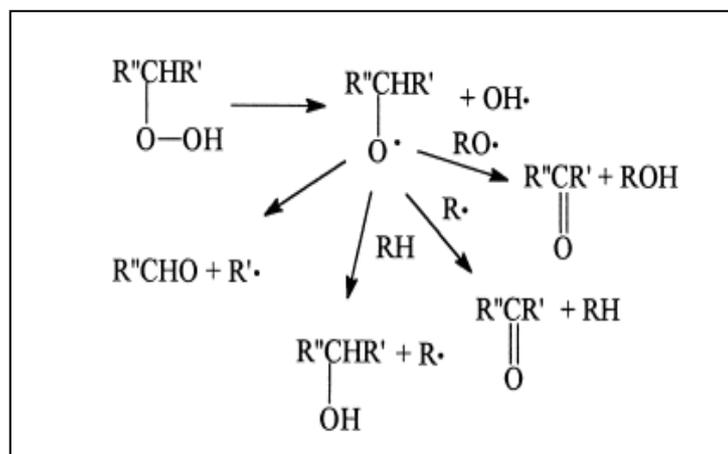
Une fois les radicaux formés, il se produit de nombreux réarrangements :

La voie majoritaire de scission des hydroperoxydes donne lieu à des radicaux hydroxyles (OH\*) et des oxyradicaux (RO\*).

Ces derniers engendrent divers produits d'oxydation ainsi que de nouveaux radicaux très réactifs pouvant entretenir la réaction ou réagir avec d'autres espèces chimiques (exemple: les amines).

Le remaniement des hydroperoxydes peut évoluer vers des fonctions époxydes, cétones, hydroxyles, furanes plus stables, avec des possibilités de cumul sur une même chaîne (**Rana, 2006**).

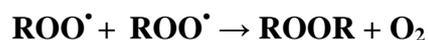
La figure 20 résume les principales voies de formation des produits secondaires d'oxydation des lipides.



**Figure 20:** Formation des produits secondaires par la décomposition des hydroperoxydes (Pokorny *et al.*, 2000).

### 2.1.3. Terminaison :

Lorsque la concentration en radicaux libres devient suffisamment importante, ces derniers peuvent se combiner pour terminer d'auto-oxydation selon les réactions de terminaison suivantes:

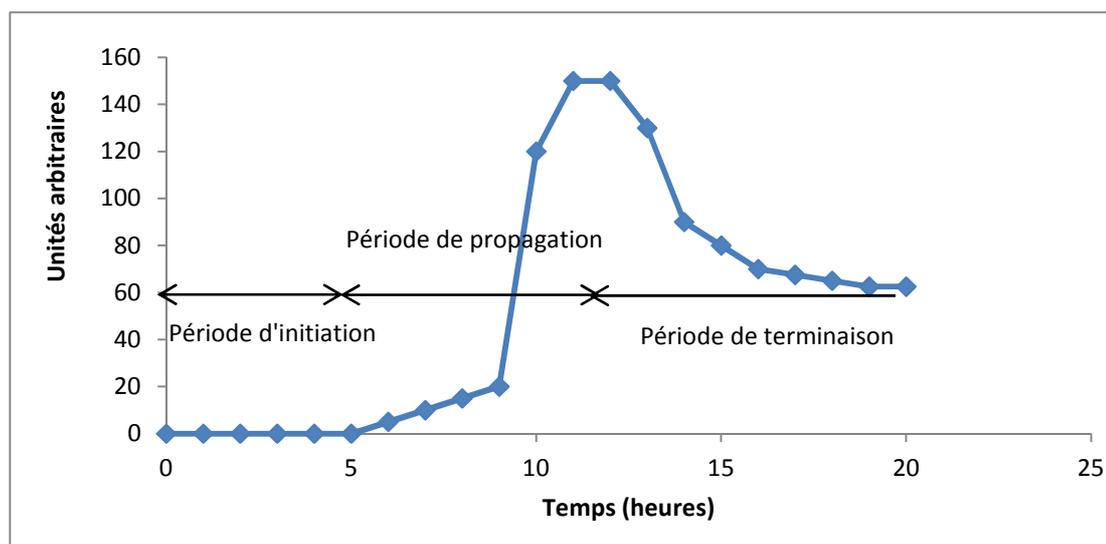


**Figure 21:** Phase de terminaison

La combinaison entre deux peroxydes prédomine lorsque la pression partielle en oxygène est élevée.

L'enthalpie d'activation des réactions de terminaison est faible mais la limite provient du facteur de probabilité de rencontre des radicaux entre eux (Croguennec *et al.*, 2006).

La figure 22 représente l'évolution de la formation des produits d'oxydation au cours des différentes périodes en fonction du temps.



**Figure 22:** Représentation schématique de l'oxydation des acides gras insaturés par l'oxygène atmosphérique (la formation des produits d'oxydation est indiquée par des unités arbitraires en fonction du temps) (Pokorny et al., 2003).

## 2.2. Oxydation des lipides par l'oxygène singulet : Photo-oxydation

Elle est très intense dans les aliments exposés à la lumière visible ou ultraviolette. En présence d'un photosensibilisateur, l'énergie irradiante convertit l'oxygène triplet en oxygène à l'état singulet qui est mille fois plus actif que l'oxygène dans son état triplet. C'est une autre voie de formation des hydroperoxydes.

Dans ce cas l'excitation des lipides (Photo-oxydation type 1) ou l'excitation de l'oxygène (Photo-oxydation type 2) peuvent avoir lieu en présence de la lumière et d'un photosensibilisateur. La réaction de la photo-oxydation ne comprend pas une phase d'induction.

### 2.2.1. Photo-oxydation type 1 :

Dans ce type de photo-oxydation, l'énergie de la lumière (ultraviolet > 280 nm, et le spectre visible) est absorbée par un photosensibilisateur, ce qui l'élève à l'état singulet.

Ensuite, un croisement intersystématique forme l'état triplet. Le sensibilisateur excité réagit directement avec une autre molécule en capturant un atome d'hydrogène. Ce mécanisme donne des radicaux libres qui peuvent initier l'auto-oxydation.

Les principales réactions ayant lieu durant ce type de photo-oxydation sont rassemblées dans la figure 23:

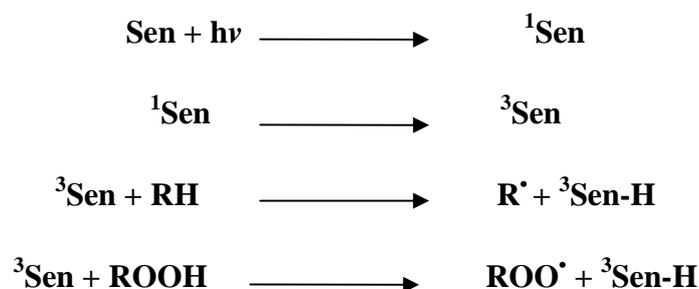


Figure 23: Photo-oxydation type 1

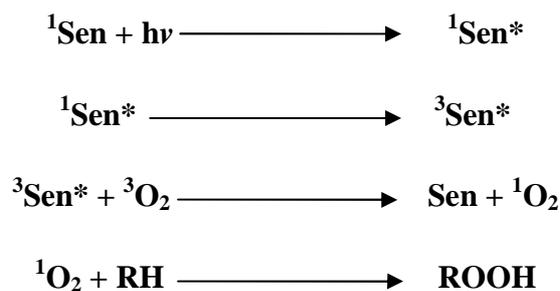
### 2.2.2. Photo-oxydation type 2:

La photo-oxydation type 2 implique aussi des photosensibilisateurs.

L'énergie électromagnétique véhiculée par les radiations du domaine visible excite le photosensibilisateur (**Sen**) d'abord dans un état singulet  ${}^1\text{Sen}^*$  puis dans un état triplet  ${}^3\text{Sen}^*$  compatible avec l'oxygène dans son état fondamental (état triplet).

L'énergie acquise par le photosensibilisateur est alors restituée et transférée à l'oxygène triplet qui est converti en oxygène singulet.

Les étapes de la photo-oxydation type 2 sont résumées dans la figure 24:



**Figure 24:** Photo-oxydation type 2

A son tour l'oxygène singulet réagit avec les doubles liaisons d'un accepteur à l'état singulet, dans la plupart des cas, lipidique (RH), ce qui aboutit à la formation d'hydroperoxydes (ROOH) (Croguennec *et al.*, 2006).

### 2.3. Oxydation enzymatique:

Plusieurs enzymes sont susceptibles de catalyser l'oxydation des lipides mais les lipoxygénases sont les plus actives (Croguennec *et al.*, 2006).

Les lipoxygénases (**linoléate oxygène oxydoréductase**) sont très répandues dans les règnes animal et végétal. De façon générale, les lipoxygénases exigent des acides gras libres comme substrat, bien qu'il y ait quelques isoenzymes qui réagissent avec les triglycérides (Pokorny *et al.*, 2000).

Les lipoxygénases sont des métalloprotéines possédant un atome de fer non hémique qui est à l'état ferreux dans l'enzyme inactive. L'activation de l'enzyme se produit lors de l'oxydation du fer ferreux couplée à la décomposition d'un hydroperoxyde en radical alkyl.

Une fois active, la lipoxygénase catalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé selon une réaction stéréospécifique et aboutit à la formation d'hydroperoxydes (Eymard, 2003).

L'oxydation enzymatique est une réaction radicalaire en chaîne qui se déroule de façon similaire à l'auto-oxydation. Elle peut être ralentie par des antioxydants phénoliques qui interrompent les réactions des radicaux libres (**Pokorny, 2003**).

### 3. Les antioxydants :

Dans l'industrie alimentaire, un antioxydant est défini comme substance qui, dans une concentration faible, est capable d'empêcher ou retarder, d'une manière significative, l'oxydation des matériaux facilement oxydables, tels que des graisses.

Cependant, les lipides ne sont pas les seules macromolécules qui peuvent souffrir l'oxydation.

Non seulement il est difficile de définir spécifiquement un antioxydant mais il n'y a aucune définition internationale admise pour ce terme.

Par exemple, l'ascorbate se protège bien contre la peroxydation de lipide de plasma, provoquée par la fumée de tabac, mais non contre des dommages de protéine de plasma (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

En termes mécanistes, un antioxydant peut être défini en tant qu'un donateur d'hydrogène ou donateur d'électron (**McDonald-Wicks et al., 2006**).

Le potentiel de réduction détermine la capacité d'un composé pour réduire chimiquement un autre. Un système avec un potentiel standard négatif de réduction ( $-E^\circ$ ) devrait réduire (donner les électrons) un système avec un  $E^\circ$  moins négatif, zéro, ou positif (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

En raison du potentiel positif inférieur de réduction, le système radicalaire Ascorbate/Ascorbyl est capable de réduire le système Radical tocophéroxyl / $\alpha$ -tocophérol.

Par conséquent, la réaction d'ascorbate (forme ionique, pH=7,4) est thermodynamiquement possible, permettant à l'ascorbate de régénérer la vitamine E (tocophérol).



L'action d'oxydation dépend également des constantes de vitesse. Dans ce sens, le radical d'hydroxyle est un oxydant extrêmement fort, pas simplement en raison de son potentiel fort de réduction mais également en raison des constantes de vitesse relativement élevées.

L'ordre de grandeur de la constante de vitesse caractéristique des réactions limitées seulement par le mouvement de molécules est 10<sup>10</sup> mol/l/s. Cet ordre de grandeur, vérifié pour assurer le radical d'hydroxyle avec beaucoup de substrats, indique qu'il y a une réaction dès qu'une collision se produira entre deux entités, c'est-à-dire à une énergie d'activation pratiquement nulle.

Les radicaux d'hydroxyle sont extrêmement réactifs, avec une diffusion très petite, et leur réactivité est reliée à l'endroit de leur formation. En outre, ils ont une durée de vie très courte 12-20 secondes (**Gardès-Albert et Jore, 2005**).

Ces réactions sont responsables des dommages biologiques étendus détectés loin de l'emplacement de leur production (**Deshpande et al., 1995**).

### 3.1. Types d'antioxydants :

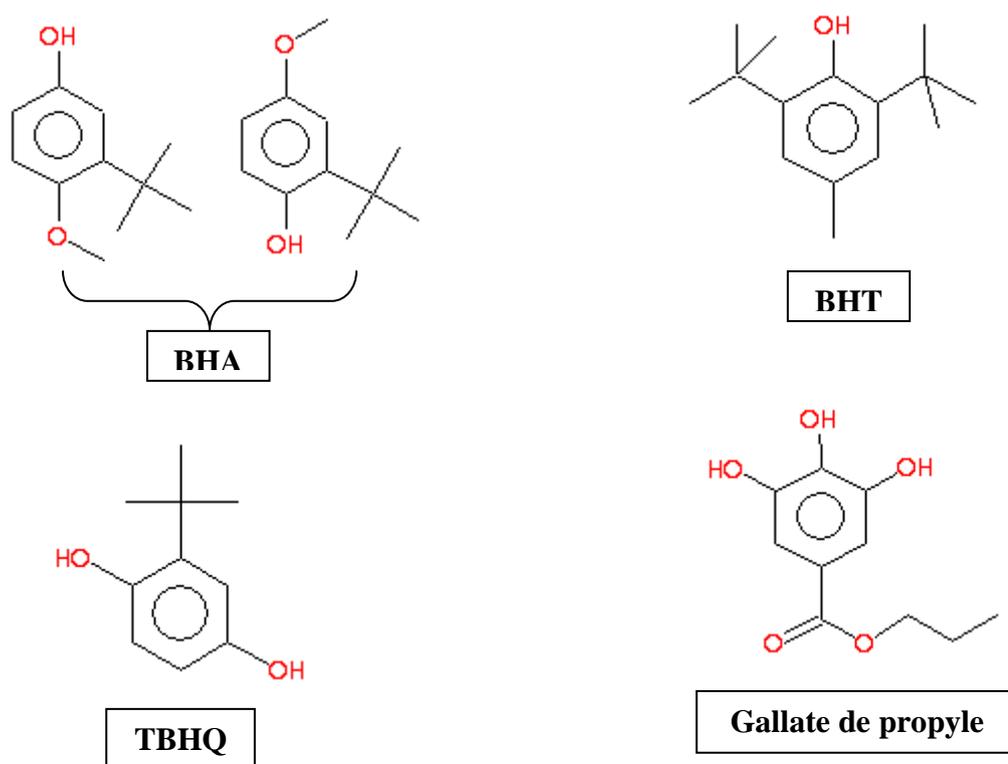
Pour prévenir ou retarder la détérioration oxydative des aliments, les antioxydants étaient largement utilisés comme des additifs dans les graisses, les huiles et dans l'industrie agroalimentaire. Il existe deux grandes familles d'antioxygènes, ceux d'origine naturelle et ceux de synthèse.

### 3.1.1. Antioxydants de synthèse :

Les antioxydants de synthèse habituellement utilisés sont les composés phénoliques comme le Butyl Hydroxy Anisole (**BHA**), Butyl Hydroxy Toluène (**BHT**) et le Ter-Butyl-Hydroxy-Quinone (**TBHQ**), et les esters de l'acide gallique.

Les antioxydants phénoliques sont toujours substitués par les alkyls qui ont prouvé une plus grande solubilité dans les graisses et les huiles.

Les principaux antioxydants de synthèse utilisés en agroalimentaire sont regroupés dans la figure 25;



**Figure 25:** Structure de quelques antioxydants de synthèse

### 3.1.2. Les antioxydants naturels:

- **Les sulfures allyliques :** Ce sont des composés caractéristiques de l'ail et sont dotés d'un fort pouvoir antioxydant qui est souvent lié à leur capacité à réduire les espèces réactives de l'oxygène ainsi qu'à l'activation des enzymes anti oxydatives.

- **Les composés phénoliques :**

Les polyphénols et les flavonoïdes constituent un grand groupe de composants chimiques largement présents dans le règne végétal.

Les flavonoïdes peuvent agir comme des antioxydants par piégeage des radicaux incluant les anions superoxydes, les peroxydes lipidiques et les radicaux hydroxyles.

Les flavonoïdes, les acides phénols et les gallates sont connus aussi pour leur pouvoir d'inhiber la lipoxygénase et l'oxygène singulet.

- **Les huiles essentielles :**

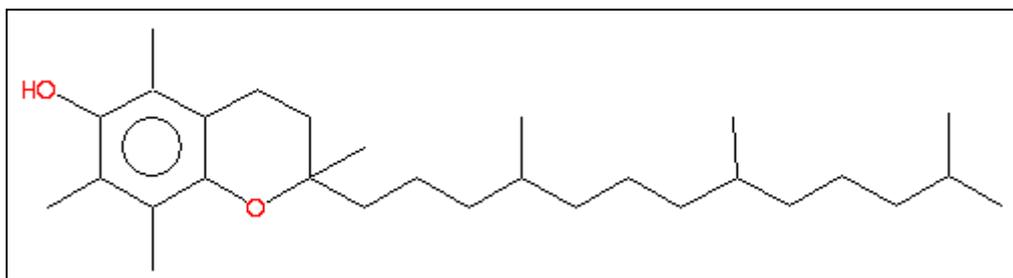
Les huiles essentielles extraites de certaines plantes aromatiques ont été aussi étudiées pour leurs activités antioxydantes. Ainsi, les composés des huiles essentielles possèdent une activité antioxydante, le profil aromatique de ces huiles essentielles limite leur utilisation comme antioxydants dans les aliments.

- **Les tocophérols (*E 307 à E 309*) :** sont des antioxydants classés comme antioxydants de rupture de chaîne, c'est à-dire qu'ils agissent au niveau de l'étape de propagation et de terminaison.

La vitamine E est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement (**Maydani, 2000**).

Il a été déterminé que la vitamine E naturelle, semble être deux fois plus biodisponible que la vitamine E synthétique (**Burton et al., 1998**).

La vitamine E est rencontrée surtout dans les huiles végétales, les noix et les germes de diverses graines (**Vansant, 2004**). La figure 26 montre la structure des tocophérols.



**Figure 26:** Structure des tocophérols

- **Les Caroténoïdes :** sont une classe de composés phytochimiques très importante, trouvés dans les légumes et fruits, également dans le lait, empêchent les dommages génétiques, protègent contre les dommages oxydants.

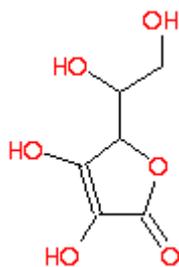
- **L'acide ascorbique (E 300 à E 304) :**

La vitamine C est un micronutriment qui n'est pas synthétisé par l'organisme humain et doit être apporté dans les aliments.

Cette vitamine hydrosoluble est capable de réagir directement avec les radicaux superoxydes, hydroxyles et l'oxygène singulet et peut jouer le rôle d'antioxydant. L'acide ascorbique agit comme un piègeur efficace de  $O_2^-$ .

$2 O_2^- + \text{acide ascorbique} + 2H^+ \rightarrow \text{acide déhydroascorbique} + 2 H_2O_2$   
(Wang et al., 2000).

La structure de l'acide ascorbique est représentée sur la figure 27:



**Figure 27:** Structure de l'acide ascorbique

### **3.2. Evaluation de la susceptibilité à l'oxydation et du niveau d'oxydation :**

#### **3.2.1. Analyse sensorielle :**

Dans l'industrie alimentaire, la détection des odeurs indésirables dues à l'oxydation par l'odorat ou le goût est la principale méthode pour décider qu'un aliment lipidique n'est plus consommable.

#### **3.2.2. Mesure de la consommation des substrats d'oxydation :**

L'étude cinétique de la consommation d'oxygène permet de mesurer la durée de la phase d'induction. On mesure l'accroissement de poids de la matière grasse sous l'effet de la fixation de l'oxygène ou la chute de pression engendrée par la consommation d'oxygène.

Selon (**Sánchez-Moreno, 2002**), l'activité antioxydante des différents extraits des plantes, huiles essentielles et autres composés purs peut être évaluée en utilisant de multiples essais in vitro.

Les tests de l'activité antioxydante sur les aliments et les systèmes biologiques peuvent être divisés en deux groupes :

- Les tests évaluant la peroxydation des lipides.
- Les tests mesurant le pouvoir de piégeage des radicaux libres.

#### **A/ Mesure des peroxydes formés :**

Pour évaluer la peroxydation des lipides, plusieurs substrats peuvent être utilisés tels que les huiles et les graisses, l'acide linoléique, les esters méthyliques d'acide gras et les lipoprotéines à basse densité (LDLs).

L'activité antioxydante dans de tels systèmes peut être détectée en mesurant le substrat et la consommation d'oxydant, et les intermédiaires ou la formation finale de produits. Dans des matrices de nourriture, plusieurs mesures peuvent être effectuées:

➤ **Mesure de l'indice de peroxyde :** La mesure de l'indice de peroxyde est un test simple et par conséquent très utilisé. Les peroxydes sont dosés par iodométrie, polarographie ou colorimétrie après réaction avec le thiocyanate ferreux ou encore par CPG après un choc thermique. Il s'exprime en mg d'oxygène actif par kg de matière grasse.

➤ **Le test SWIFT ou AOM (*active oxygen method*):** de l'air ou de l'oxygène purifié est mis à barboter dans un échantillon lipidique maintenu à 97,8°C. Le dosage des peroxydes permet de mesurer la susceptibilité des lipides à l'oxydation.

➤ **Le test ORAC (*The oxygen radical absorbance capacity*):** suit la peroxydation d'un aliment qui est provoquée par un radical hydrosoluble stable initiateur, par la perte de fluorescence de la fluorescéine. Elle s'exprime par l'aire nette sous la courbe représentant l'intensité de fluorescence à 515 nm en réponse à une excitation à 493 nm en fonction du temps.

➤ **La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) :**  
L'analyse est basée sur la mesure des radicaux libres formés durant les stades initiaux de l'oxydation. Contrairement aux tests d'oxydation accélérés, cette analyse s'effectue à basse température, à 60°C environ.

➤ **Les diènes conjugués:** La formation des hydroperoxydes à partir des acides gras polyinsaturés conduit à la conjugaison de la structure pentadiène. Cela cause l'absorption des radiations UV à **233-234 nm**. Cela représente une méthode simple et rapide pour évaluer la détérioration oxydative d'une huile.

La plupart des tests basés sur des substrats lipidiques ont besoin des états accélérés d'oxydation : pression et la température partielles accrues de l'oxygène ; addition des catalyseurs en métal de transition ; exposition à la lumière ; et secousse de variable et sources de radical libre (**Miguel, 2010**).

#### **B/ Mesure des produits de décomposition des peroxydes :**

Pour mesurer des capacités de piégeage de radical libre, les méthodes sont divisées en deux groupes, selon les réactions chimiques impliquées: les méthodes basées sur la réaction de transfert d'atome d'hydrogène et celles basées sur un simple transfert d'électron (**Huang et al., 2005**); (**McDonald-Wicks et al., 2006**).

Les deux types de réaction peuvent se produire simultanément et la réaction dominante dans le système peut être déterminée selon les dispositifs suivants :

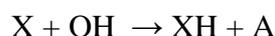
- La structure et les propriétés antioxydantes ;
- La solubilité et les coefficients de partage ;
- Le système dissolvant.

L'énergie de dissociation et le potentiel d'ionisation sont deux facteurs qui déterminent le mécanisme d'action et l'efficacité des antioxydants (**Wright et al., 2001**) ; (**Prior et Shaish, 2005**).

En outre, les tests évaluant l'efficacité contre plusieurs espèces réactives à l'oxygène et à l'azote ( $O_2$ , OH,  $ONOO^-$ ,  $H_2 O_2$ ) sont également nécessaires et sont généralement exécutés.

#### **-Méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène :**

L'antioxydant peut piéger les radicaux libres par donation d'hydrogène :



La réactivité relative de ces méthodes est déterminée par l'énergie de dissociation du groupe de l'antioxydant, qui est caractéristique pour des composés avec une énergie de dissociation -10 kcal/mol et un potentiel d'ionisation <- 36 kcal/mol.

Ces réactions ne dépendent ni du pH et ni du solvant utilisées et sont très rapides (habituellement accompli en secondes aux minutes).

La présence des agents réducteurs (ions en métal) dans de telles méthodes n'est pas recommandée parce qu'elle peut lancer une réactivité élevée (**Prior et Shaish, 2005**).

Les méthodes basées sur la réaction de transfert d'atome d'hydrogène incluent:

Inhibition d'oxydation induite de LDL;

Capacité radicale d'absorbance de l'oxygène (ORAC);

Paramètre antioxydant de piégeage radical total (TRAP);

Analyses de blanchissement.

#### **-Méthodes basées sur un simple transfert d'électron :**

Ces méthodes permettent de mesurer la capacité d'un antioxydant de transférer un électron pour réduire un composé, y compris des métaux, les groupes carbonyliques et les radicaux.

La réactivité relative de la méthode du transfert simple d'électron est basée sur la déprotonation dans le potentiel d'ionisation du groupe fonctionnel réactif.

Par conséquent, les méthodes de transfert simple d'électron sont pH-dépendantes.

Généralement, le potentiel d'ionisation diminue avec l'augmentation des valeurs du pH, qui reflète une capacité de donation plus élevée avec la déprotonation.

L'action antioxydante est principalement de type de transfert d'électron quand les valeurs potentielles d'ionisation sont supérieures à  $-45$  kcal/mol.

Les réactions basées sur le transfert d'électron sont habituellement lentes et des calculs sont basés sur la diminution de pourcentage de produit plus qu'en termes cinétiques.

Ces méthodes incluent :

- Dosage des phénols totaux avec le réactif de Folin-Ciocalteu.
- Mesure du pouvoir de réduction du fer ferrique.
- Test du potentiel antioxydant total utilisant le complexe  $\text{Cu}^{+2}$  comme agent oxydant.
- Test au 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Comme rapporté ci-dessus, parfois les résultats obtenus par différentes méthodes ne sont pas comparables, en raison de plusieurs facteurs comme: la structure physique du système d'essai; la nature du substrat d'oxydation; la présence des composants agissants l'un sur l'autre; le mode de lancement l'oxydation; et la méthode analytique de mesurer l'oxydation.

Il y a un grand besoin de normaliser des analyses antioxydantes afin de réduire au minimum le désordre actuel dans les méthodologies.

Pour des produits alimentaires, quelques auteurs proposent un arrangement qui inclut trois étapes principales dans l'évaluation antioxydante des échantillons:

1. Quantification et identification des composés phénoliques.
2. Quantification de l'activité de piégeage des radicaux libres, en utilisant plus d'une méthode et en considérant l'effet du solvant sur l'action de l'antioxydant.
3. L'évaluation de la capacité d'un antioxydant à inhiber ou à arrêter l'oxydation des lipides dans un système model adéquat (**Miguel, 2010**).

## *Partie pratique*

- *Chapitre 1 : Matériels et méthodes*
- *Chapitre 2 : Résultats et discussions*

## *Chapitre 1 : Matériels et méthodes*

## Matériels et méthodes :

### 1. Matériel végétal:

Les huiles essentielles ont été extraites à partir des parties aériennes (feuilles et fleurs) de deux espèces de la famille des lamiacées, de même les extraits éthanoliques ont été obtenus à partir des feuilles de ces mêmes plantes.

Le tableau 6 montre les espèces étudiées et leurs provenances:

**Tableau 6:** Espèces de lamiacées étudiées.

Famille botanique	Espèces	Provenance	Stade de récolte
Lamiacées	<i>Lavandula stoechas</i> L.	Azzazga (Tizi Ouzou)	Début de floraison
	<i>Rosmarinus eriocalyx</i> Jord. & Fourr.	Tablat (Médéa)	Début de floraison

#### ➤ Description des espèces étudiées :

: Selon (Quezel et Santa, 1963)

- *Lavandula stoechas* L. est un sous-arbrisseau aromatique. L'inflorescence est en épis denses terminaux avec des fleurs bractéolées. Le calice est tubuleux à 5 dents courtes inégales et la corolle est exserte à tube dilaté à la gorge, la lèvre supérieure est composée de deux lobes, et la lèvre inférieure en possède 3, les étamines sont incluses.

Les feuilles sont entières, grisâtres sur les 2 faces et à marges révolutes. Les tiges florifères sont feuillées jusque sous les épis. Les fleurs et les bractées sont violettes.

- *Rosmarinus eriocalyx* Jord. & Fourr.: est une des trois espèces de romarin; caractérisée par une inflorescence et un calice à pilosité double, l'une courte, l'autre constituée par de longs poils dressés glanduleux au sommet. Les inflorescences sont plus longues, à bractées amples cordiformes longues de 3-4 mm.

En Algérie on la trouve généralement sur les côtes oranaises et algéroises où elle pousse à l'état sauvage sur les garrigues rocailleuses et elle constitue une espèce endémique.

## 2. Matériel entomologique :

Le but de cet élevage est l'obtention des adultes de *Callosobruchus maculatus* utiles dans nos expériences réalisées sur les graines de pois chiches (*Cicer arietinum*).

L'élevage de masse de la bruche *Callosobruchus maculatus* a été conduit dans des bocaux en verre de 15,5 cm de hauteur et 8 cm de diamètre, sur des graines de pois chiches (*Cicer arietinum*) (jamais traitées par les insecticides) avec un poids de 100 g dans chaque bocal (Figure 28).

La souche d'origine des bruches provient du laboratoire d'Entomologie de l'Université de Tizi-Ouzou. Pour accélérer l'élevage de masse nous avons utilisé des couples d'insectes, sans détermination du nombre, et des graines de pois chiches préalablement contaminées.



**Figure 28:** L'élevage de *Callosobruchus maculatus* F. dans des bocaux en verre à l'intérieur de l'étuve.

Chaque bocal est infesté par 15 couples de bruches pour assurer une reproduction rapide. Les bocaux ont été ensuite transférés dans une étuve réglée à une température de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  et une humidité relative de  $70 \pm 5\%$ , ce qui constitue les conditions optimales de développement de cet insecte.

### 3. Coupes anatomiques:

Pour une meilleure compréhension des phénomènes d'extraction et afin de localiser les organes sécréteurs des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) des espèces étudiées, une observation de la structure anatomique des deux organes est nécessaire, ainsi des coupes transversales au niveau des feuilles et fleurs ont été réalisées.

La préparation de ces coupes a eu lieu au niveau du laboratoire de botanique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

#### ➤ **Protocole opératoire :**

Une moelle de sureau a été utilisée afin d'obtenir des coupes suffisamment minces pour pouvoir les observer au microscope photonique.

– Afin de vider les cellules de leur contenu, un prétraitement pendant 20 min dans une solution d'hypochlorite de sodium (Eau de Javel) à 12°C a été réalisé.

– Un rinçage dans de l'eau distillée durant 1 à 5 min, puis dans de l'acide acétique à 5 % pendant 5 min a été effectué.

– Une coloration des coupes en utilisant le carmino-vert permettra de différencier les parois cellulosesiques (couleur rose) des parties lignifiées (couleur verte).

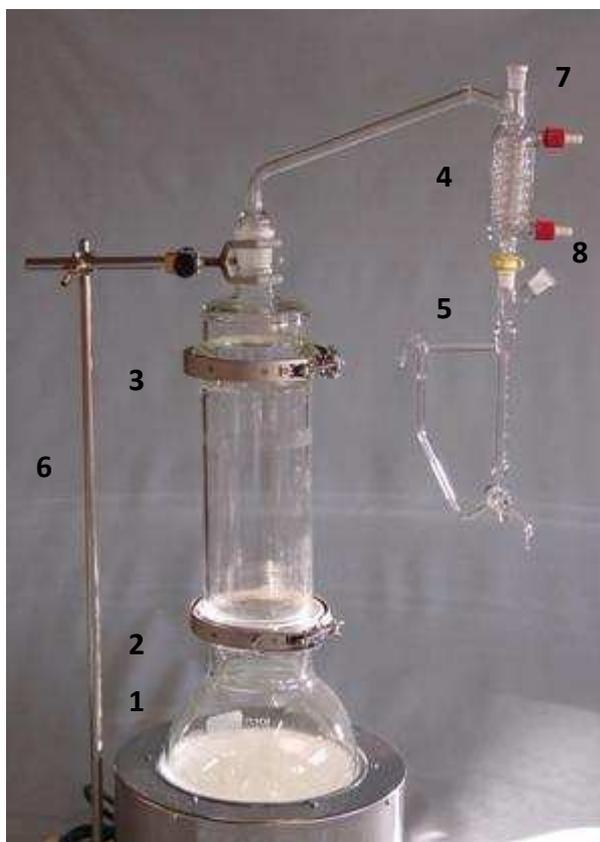
### 4. Extraction des huiles essentielles:

Les extractions ont été effectuées sur les parties aériennes des deux plantes étudiées. Elles ont été réalisées dans les deux cas à partir d'une matière fraîche et broyée au laboratoire de Chimie de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, l'appareil utilisé est de type Clevenger-modifié.

#### **4.1. Mode opératoire :**

Pratiquement, pour chaque plante étudiée, 100 grammes de matière végétale fraîche ont été introduits dans le ballon de 2 litres, rempli aux 2/3 de son volume d'eau distillée. Ensuite, le ballon a été chauffé pendant 3 heures. Le ballon chauffé produit de la vapeur chargée de produits volatils. Cette vapeur se condense au contact du réfrigérant.

Le condensat est recueilli dans une ampoule à décanter où l'on sépare la phase aqueuse de la phase organique qui constitue l'huile essentielle (Figure 31).



**Figure 29:** Montage de l'appareil de Clevenger-modifié.

**1:** Chauffe-ballon.

**2:** Ballon de 2 litres (eau+matière végétale).

**3:** Colonne en verre.

**4:** Réfrigérant.

**5:** robinet réglable.

**6:** support métallique.

**7:** Sortie de l'eau chaude

**8:** Arrivée de l'eau froide.

L'huile essentielle est déposée par la suite sur un desséchant de type sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), afin d'éliminer d'éventuelles traces d'eau, puis pesée afin de calculer le rendement de l'extraction par rapport à la masse du matériel végétal frais.

L'huile essentielle est conservée au réfrigérateur à une température de 4°C, à l'abri de la lumière dans un flacon en verre fermé hermétiquement en vue de son analyse.

#### 4.2. Rendement de l'extraction:

Différentes méthodes d'exprimer le rendement en huile essentielle sont utilisées. Soit en rapportant en pourcentage la masse de l'huile essentielle récupérée à la masse de la matière végétale sèche ou fraîche utilisée, soit en rapportant le volume de l'huile essentielle recueillie (exprimée en ml) pour 100 g de matière végétale sèche ou humide utilisée.

Dans notre travail nous avons exprimé le rendement en considérant le rapport du volume d'huile essentielle récupérée et de la matière végétale fraîche, il est exprimé en pourcentage et donné par la relation suivante:

$$R \% = V_{HE} / 100 \text{ grammes de la matière végétale fraîche}$$

$V_{HE}$ : Volume d'huile essentielle récupéré exprimé en ml.

#### 5. Extraits éthanoliques:

##### 5.1. Préparation de l'extrait des feuilles:

L'extrait a été obtenu à partir des feuilles de *L. stoechas* L. et *R. eriocalyx* Jord. & Fourr. en utilisant une technique d'extraction solide-liquide par Soxhlet.

##### ➤ Broyage:

Les échantillons séchés ont été broyés jusqu'à obtention d'une poudre très fine conservée dans un flacon en verre étiqueté.

##### ➤ Extraction:

Dans notre étude, une extraction solide-liquide par Soxhlet a été réalisée au laboratoire de chimie de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique. 20 g de poudre des feuilles ont été mis dans une fiole avec 100 ml d'éthanol à 99%.

Après l'extraction solide/liquide par Soxhlet pendant 6 heures, on a obtenu un solvant riche en substances extraites, ce solvant a été en partie évaporé dans un évaporateur rotatif. L'extrait ainsi récupéré est a été placé dans un dessiccateur, pesé et conservé à 4-6°C jusqu'à utilisation.

## 5.2. Rendement en extrait:

Le taux d'extraction est calculé comme suit :

$$\text{Le taux de matière extraite (\%)} = [(P_0 - P_1) / E] \times 100$$

$P_0$  : poids du bécher vide (g).

$P_1$  : poids du bécher après évaporation du solvant (g).

$E$  : poids de l'échantillon (poudre) (g).

## 6. Caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques des huiles essentielles:

### 6.1. Caractéristiques organoleptiques:

L'aspect, la couleur, et l'odeur des huiles essentielles ont été déterminés en utilisant nos sens comme des indicateurs.

### 6.2. Caractéristiques physico-chimiques:

Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles sont importantes surtout du point de vue commercial, car elles sont soumises à une législation et une normalisation. Elles sont déterminées par une série d'analyses qui sont indiquées par le recueil de normes de la l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

- **Indices physiques:**

- A. Densité relative:**

La densité relative des huiles essentielles a été déterminée selon la norme **NF T 75-111**, elle est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à **20°C**, à la masse d'un égal volume d'eau distillée à la même température.

Cette grandeur est sans dimension et son symbole est :  $d_{20}^{20}$

- B. Indice de réfraction:**

La mesure de l'indice de réfraction des huiles essentielles a été effectuée selon la norme NF T-112 à l'aide d'un appareil du type **Bellingham**. Lorsque celle-ci est effectuée à une température T (°C) différente de **20°C**, on effectue alors la correction à **20°C** par le biais de la formule suivante:

$$n_D^{20} = n_D^T + 0,0004(T - 20)$$

$n_D^T$  : Valeur de la lecture obtenue à la température T (°C).

## 7. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles:

### 7.1. Analyse qualitative des huiles essentielles par CPG :

L'analyse qualitative des huiles essentielles des deux plantes étudiées a été effectuée au laboratoire d'analyse instrumentale du département de technologie alimentaire à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, selon les conditions opératoires suivantes :

➤ **Sur colonne DB-5** : Cette colonne a été utilisée pour l'analyse des huiles essentielles de lavande et du romarin.

- Appareil de type CP Chrompack 9002;

- Colonne capillaire : DB-5 de phase stationnaire en silice fondu de longueur: 30 m et de diamètre interne : 0,32 mm; épaisseur du film de la phase: 0,25  $\mu\text{m}$ .
- Températures de l'injecteur et du détecteur (FID), 250 et 280°C respectivement ;
- Programmation de la température: 50°C pendant 3 min puis augmentation de la température à raison de 2°C/min jusqu'à 250°C ; maintenue en isotherme pendant 10 min.
- Gaz vecteur : azote selon un débit de: 1 ml/min ;
- Volume du gaz vecteur injecté: 0,2  $\mu\text{l}$  dans le mode d'injection split avec un rapport de division de 1/50.

➤ **Sur colonne Stabilwax<sup>TM</sup>**: Cette colonne a été utilisée dans l'analyse de l'huile essentielle de lavande.

- Appareil : HP 6890 (Hewlett-Packard) ;
- Colonne capillaire Stabilwax<sup>TM</sup> polyéthylèneglycol (PEG)
- Phase stationnaire : diphényl à 5%, diméthylsiloxane à 95%. Longueur : 30 m, diamètre interne : 0,32 mm et une épaisseur de 0,25  $\mu\text{m}$ .
- Programmation de la température : 60°C pendant 8 min, puis augmentation de 2°C/min jusqu'au 280°C.
- Température de l'injecteur et du détecteur (FID) sont maintenues respectivement à 250 et 320°C.
- Gaz vecteur: azote avec un débit de: 0,3 ml/min.
- Volume du gaz vecteur injecté: 0,2  $\mu\text{l}$ .

L'identification des composés a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétention en programmation de température à ceux cités dans la littérature ainsi qu'à ceux d'étalons injectés dans les mêmes conditions.

Pour le calcul de ces indices, un mélange d'alcane ( $\text{C}_6\text{-C}_{24}$ ) est injecté dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon.

Les indices de Kováts désignés par **IK** sont calculés selon la formule de **Kováts (1965)**:

$$\mathbf{IK = 100z + 100n (t_{RC} - t_{Rz} / t_{Rz+n} - t_{Rz})}$$

$t_{Rc}$  : temps de rétention du composé étudié (**min**).

$t_{Rz}$  : temps de rétention de l'alcane à **z** atomes de carbones qui précède le composé étudié (**min**).

$t_{Rz+n}$  : temps de rétention de l'alcane à **z+n** atomes de carbones qui suit le composé (**min**).

**n** : différence des nombres d'atomes de carbone.

## 7.2. Analyse semi-quantitative par CPG/SM :

### 7.2.1 Huile essentielle de Romarin:

Cette analyse à été effectuée au laboratoire de chromatographie du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) de la faculté de Chimie à l'Université Houari Boumediene (Bab Ezzouar), selon les conditions opératoires suivantes:

#### ➤ Chromatographie phase gazeuse (CPG):

##### Sur colonne apolaire :

- Appareil du type GC 6890 séries GC systèmes (HP Agilent Technologies).
- Colonne apolaire: HP5-MS (100% dimethylpolysiloxane); longueur: 30 m; diamètre interne: 0,25 mm; épaisseur du film de la phase: 0,25  $\mu$ m.
- Programmation de la température: 60°C en isotherme pendant 8 min puis augmentation de la température à raison de 2°C/min jusqu'à 280°C puis laissée en isotherme pendant 30 min.
- Température de détection: 280°C.
- Gaz vecteur: Hélium; avec un débit de 0,5 ml/ min.
- Volume injecté: 0,2  $\mu$ l; selon un mode d'injection: Split à une température de 250°C.

**Sur colonne polaire :**

- Appareil de type GC 6890 séries GC systèmes (HP Agilent Technologies) ;
- Colonne capillaire: Stabilwax™ de phase stationnaire polyéthylèneglycol (PEG) de longueur: 60 m ; et de diamètre interne: 0,2 mm; épaisseur du film de la phase: 0,25 µm.
- Températures de l'injecteur et du détecteur (FID), 250 et 280°C respectivement ;
- Programmation de la température: 50°C pendant 3 min puis augmentation de la température à raison de 2°C/min jusqu'à 220 °C; maintenue en isotherme pendant 15 min.
- Gaz vecteur: Azote; débit du gaz vecteur: 1 ml/min ;
- Volume injecté: 0,2 µl dans le mode d'injection split avec un rapport de division de 1/20.

**➤ Spectrométrie de masse (SM):**

- Appareil: HP-5973 (HP Agilent Technologies).
- Mode de détection: Scan.
- Potentiel d'ionisation: 70 eV.
- Pression (Source, analyseur): 6,75 Psi.

**7.2.2. Huile essentielle de Lavande:**

Cette analyse a été effectuée au laboratoire en commun à l'Institut Algérien de Pétrole (Boumerdes) selon les conditions opératoires suivantes :

**➤ Chromatographie en Phase Gazeuse:**

- Appareil type: GC17A. SHIMADZU
- Colonne apolaire OV-1; (méthylsilicone) longueur: 30 m; diamètre interne : 0,25 mm; épaisseur du film de la phase : 0,25 µm.

- Programmation de la température: 70°C pendant 2min; puis augmentation de 3°C/min jusqu'à 280°C.
- Gaz vecteur: Hélium avec un débit de 1ml/min.
- Pression: 60,6 K Pascal.
- Volume injecté: 0,2 µl.

➤ **Spectrométrie de Masse (SM):**

- Appareil: type QP-5000.
- Potentiel d'ionisation: 70eV.
- Pression: 10<sup>-7</sup> mbar
- Mode de détection: Impact électronique.

**L'identification des constituants des huiles essentielles extraites est basée sur :**

- La comparaison des spectres de masse des molécules inconnues à ceux des composés purs cités dans la littérature.
- L'ordre d'élution du composé sur la colonne considérée.
- La comparaison des indices de rétentions en programmation de température à ceux cités dans la littérature sur le même type de colonne.
- La proposition et le pourcentage de probabilité de présence du composé, fournis par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse (**Wiley 7N**).

**8. Analyse des extraits éthanoliques:**

**8.1. Dosage des composés phénoliques :**

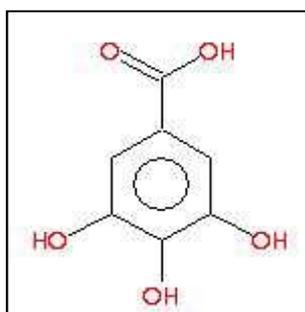
L'évaluation de la teneur en phénols totaux a été réalisée selon la méthode de Folin-Ciocalteu.

➤ **Principe:**

Le réactif de Folin-Ciocalteu, mélange de l'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et de molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ).

La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel (**Riberau-Gayon, 1968**).

Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique dont la formule chimique est représentée sur la figure 30:



**Figure 30:** Structure de l'acide gallique

**Mode opératoire :**

Un volume de 1 ml d'extrait est dilué dans 2 ml de solvant d'extraction. Ensuite, 100  $\mu\text{l}$  de cet extrait dilué sont mélangés avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Après 3 minutes de temps de réaction du mélange, 1 ml de la solution de carbonate de sodium (**75 g/l**) a été ajouté au mélange. Après 30 minutes, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à **765 nm**. L'expérience est répétée trois fois.

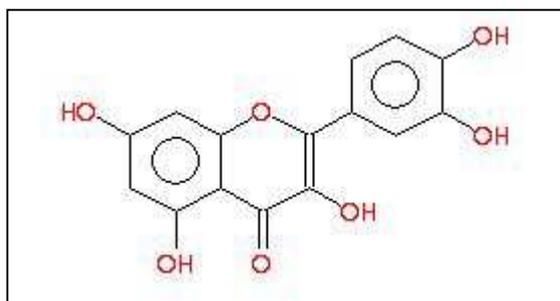
La concentration en composés phénoliques est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, et sera exprimée en **mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait**.

**8.2. Dosage des flavonoïdes:**

La teneur en flavonoïdes est estimée selon la méthode au  $\text{AlCl}_3$  (**Lamaison et Carnet, 1990**) modifiée.

➤ **Principe :**

Le trichlorure d'Aluminium forme un complexe avec les flavonoïdes dont on dose l'absorbance. Le flavonoïde standard utilisé dans cette méthode est la quercétine dont la formule chimique est représentée sur la figure 31 :



**Figure 31:** Structure de la quercétine

➤ **Mode opératoire :**

1 ml de l'extrait dilué est ajouté à 1 ml de la solution éthanolique de trichlorure d'aluminium. Après une heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 420 nm.

Cette expérience est répétée trois fois. La teneur en flavonoïdes est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage de la quercétine et sera exprimée en **mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait**.

### **9. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits:**

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par deux méthodes de références citées dans la littérature qui sont le pouvoir réducteur et l'activité d'inhibition du radical DPPH (2,2-Diphényl 1-picrylhydrazyl).

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits éthanoliques a été comparé à un antioxydant de synthèse le **BHT**. Tous les tests ont été réalisés trois fois pour chaque concentration.

### 9.1. Activité de piégeage du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl):

#### ➤ Principe :

Le piégeage des radicaux libres est le principal mécanisme suivant lequel les antioxydants agissent dans les aliments. Plusieurs méthodes ont été développées en vue d'évaluer l'activité d'un antioxydant par le piégeage d'un radical synthétique dans un solvant polaire comme l'éthanol à température ambiante.

Dans le test du DPPH, le piégeage du radical DPPH (**2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl**) est suivi d'une diminution de l'absorbance à 517 nm, qui est due à la réduction du radical par l'antioxydant (AH).

L'activité est souvent exprimée en termes de  $IC_{50}$  qui est la concentration en antioxydant nécessaire pour piéger 50% des radicaux DPPH.

#### ➤ Mode opératoire:

L'expérience a été effectuée dans un spectrophotomètre UV-Visible de type UNICAM HELIOS  $\lambda$  à la longueur d'onde de 517 nm.

Le test utilisant le radical DPPH est réalisé selon la méthode décrite par **Burits et Bucar (2000) et Sahin et al. (2004)**, où 25  $\mu$ l de chacune des dilutions des huiles essentielles et d'extraits testés sont mélangés dans la cellule placée dans la cuvette du spectrophotomètre avec 975  $\mu$ l d'une solution éthanolique de DPPH (60  $\mu$ M).

Après une période d'incubation de 30 min à l'abri de la lumière et de l'oxygène atmosphérique, et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. Les expériences sont réalisées en 3 répétitions pour chaque concentration.

L'activité antioxydante (I%) est donnée par la formule suivante :

$$I (\%) = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{éch}}) / (A_{\text{blanc}})] \times 100$$

$A_{\text{blanc}}$ : Absorbance du témoin, il représente l'absorbance du DPPH au temps zéro avant addition de l'échantillon d'huile essentielle, extrait ou témoin) à une concentration donnée.

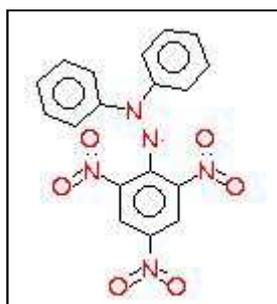
$A_{\text{éch}}$ : Absorbance de l'échantillon testé après 30 min.

➤ **Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux :**

La concentration inhibitrice de 50% des radicaux est définie comme étant la concentration d'antioxydants nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux.

Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant.

La figure 32 illustre la structure du radical DPPH :



**Figure 32:** Structure du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

## 9.2. Mesure du pouvoir réducteur:

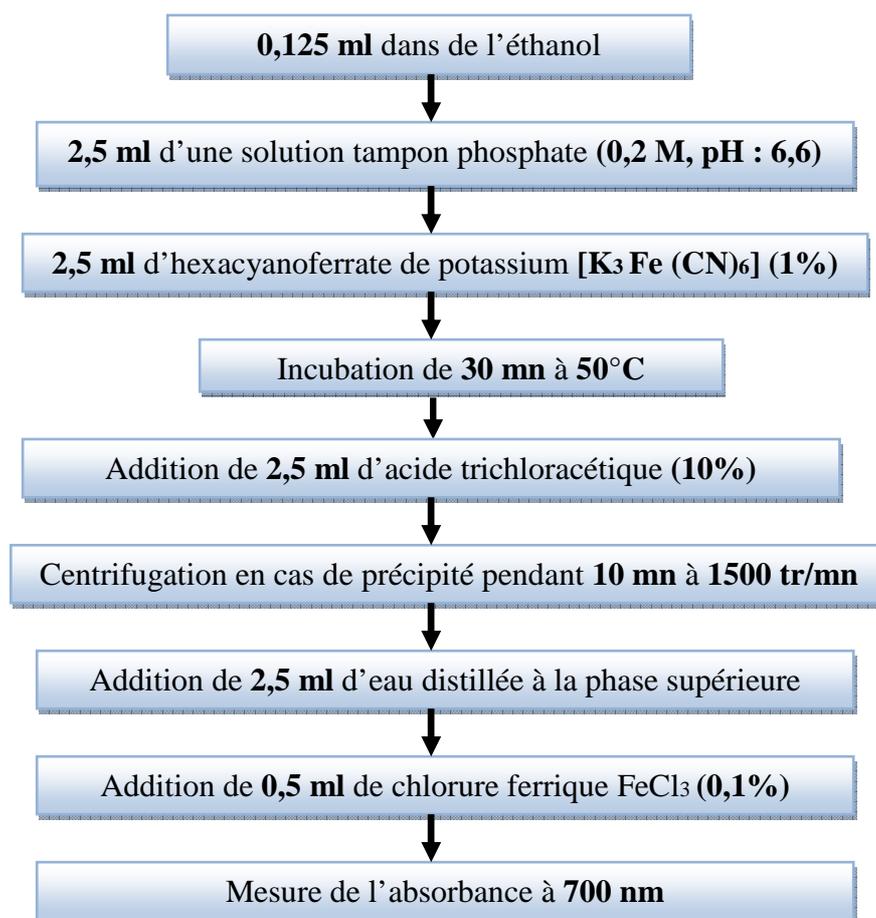
➤ **Principe:**

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans les huiles essentielles et l'extrait à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure- $\text{Fe}^{+3}$  en fer ferreux. Cette aptitude est évaluée par la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**.

La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'huile essentielle.

➤ **Mode opératoire:**

Les étapes de la réalisation de la mesure du pouvoir réducteur des huiles essentielles et extraits sont regroupées dans la figure 33:



**Figure 33:** Protocole de mise en œuvre du test du pouvoir réducteur.

## 10. Estimation de l'activité insecticide des huiles essentielles sur *Callosobruchus maculatus* F.

### 10.1. Objectifs :

Evaluer l'activité et insecticide de deux huiles essentielles du romarin (*Rosmarinus eriocalyx*) et de la lavande (*Lavandula stoechas*) vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus* selon deux modes de pénétration le contact et l'inhalation. Pour chaque mode un essai sur l'évaluation de l'efficacité a été mis en place.

### 10.2. Critères d'évaluation retenus:

L'activité insecticide des deux huiles essentielles étudiées est évaluée par l'observation de la mortalité des adultes et par l'étude de deux paramètres biologiques représentés par la fécondité et le pourcentage d'éclosion des œufs.

### 10.3. Matériel animal :

Les plantes utilisées pour l'extraction des huiles essentielles pour nos tests insecticides sont décrites dans le paragraphe 1 du chapitre Matériel et méthodes

### 10.4. Matériel végétal :

L'espèce de bruche sur laquelle nous voulons tester l'effet insecticide des huiles essentielles étudiées est indiquée dans le paragraphe 2 du chapitre Matériel et méthodes

### 10.5. Essais d'efficacité des huiles essentielles sur *Callosobruchus maculatus*:

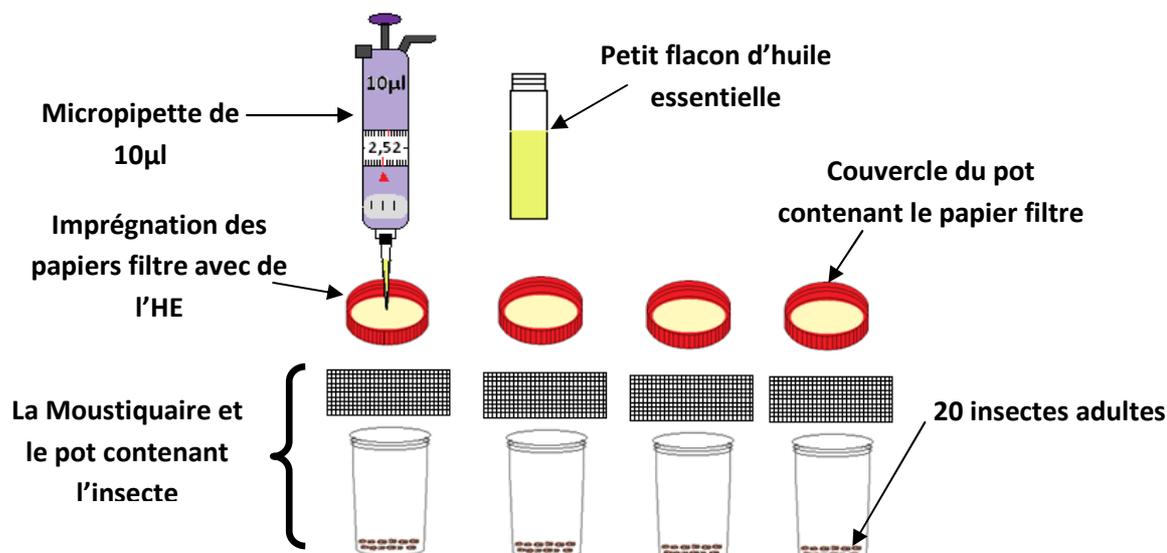
#### 10.5.1. Evaluation de la mortalité des adultes de *Callosobruchus maculatus* par effet inhalation :

Dans ce test la dose est fixée, mais le temps reste variable.

Pour chaque huile essentielle, on prépare une solution de concentration **2 µl/ml** d'acétone, qui est une dose suffisante pour saturer l'atmosphère interne des petits pots cylindriques (de **3,67 cm** de diamètre et de **6,5 cm** de hauteur) c'est-à-dire d'un volume de **68,72 cm<sup>3</sup>**.

La quantité de l'huile essentielle choisie correspond à une dose de (**0,0291 µl/cm<sup>3</sup>**) exprimée en volume d'huile essentielle par volume d'air de l'enceinte et utilisée en application unique.

Les tests de toxicité ont été effectués dans des pots cylindriques. La charge d'huile essentielle (**2 µl**) a été déposée sur un disque de papier filtre Whatman de **4 cm** de diamètre pour favoriser son évaporation dans les pots et accélérer le mode d'action par inhalation. Le témoin est réalisé sans aucun traitement (utilisation uniquement du papier filtre).



**Figure 34:** Traitement des insectes par les huiles essentielles pour le test inhalation.

Afin de saturer l'ambiance interne, les pots d'huiles essentielles sont maintenus fermés pendant **15 min**, ensuite **5** couples d'adultes de *Callosobruchus maculatus* sont introduits rapidement. Avant de fermer, la moustiquaire est placée sur l'ouverture du pot dans le but d'empêcher l'insecte de se mettre en contact avec le papier filtre. Le pot est fermé pour éviter toute fuite d'odeur.

Tous les tests de toxicité ont été réalisés à température ambiante (25°C) et à une humidité relative de 73%.

Nous avons choisi quatre temps de lecture (12, 24, 36, 48 heures) à partir du temps au bout duquel tous les insectes sont morts (48 heures). Ainsi, nous avons effectué 10 répétitions et un témoin pour chaque temps.

Le comptage des insectes morts est effectué sous une loupe binoculaire, nous avons considéré comme individus morts, les insectes qui ne tenaient plus sur leurs pattes.

### **10.5.2. Evaluation de la mortalité des adultes de *Callosobruchus maculatus* par effet contact:**

L'essai est réalisé dans des bocaux en verre d'une capacité de 500 ml contenant 100 g de pois chiche chacun ce qui correspond environ à 30 graines. Une solution acétonique de l'huile

essentielle a été convenablement mélangée dans le bocal en verre. Après évaporation de l'acétone à l'air libre chaque bocal ainsi traité est infesté par 5 couples d'adultes âgés de zéro à 24 h. Le témoin est traité uniquement à l'acétone.

Les bocaux ainsi préparés sont fermés à l'aide d'une moustiquaire fine et déposés dans une étuve obscure réglée à une température de 25 °C et une humidité relative de 73%. Le dénombrement des individus morts est noté quotidiennement et le cumul est calculé au bout de cinq jours.

Le choix des doses a été basé sur des tests préliminaires. La dose de **0,25 µl** d'huile essentielle/g de pois chiche a été retenue comme dose initiale ; à partir de cette dose trois autres doses ont été choisies selon une progression géométrique de raison de 2 soit **0,25 ; 0,5 ; 1 et 2 µl HE/gde pois chiche.**

Pour répartir ces petites doses d'huiles essentielles de manière homogène sur les graines de pois chiche, une dilution de ces huiles est effectuée dans de l'acétone, solvant très volatil, sans effet résiduel et sans interaction avec les composantes des huiles essentielles. La quantité d'acétone de 1ml pour traiter 100g de pois chiche est déterminée par un essai préliminaire. Dix répétitions sont réalisées pour chaque concentration de même que pour le témoin.

### **10.5.3. Evaluation de l'effet des deux huiles essentielles sur la fécondité:**

Le dispositif précédent adopté pour déterminer l'effet des huiles essentielles sur la mortalité des adultes de *C. maculatus* par effet contact a été utilisé parallèlement pour l'évaluation de l'effet des deux huiles essentielles sur la fécondité qui est définie comme étant le nombre d'œufs pondus par femelle.

Pour tester l'effet des huiles essentielles sur la fécondité de l'insecte étudié, à l'aide d'une loupe binoculaire, on dénombre les œufs pondus par les femelles de *C. maculatus* chaque 24 heures (Dix répétitions sont réalisées pour chaque dose).

#### 10.5.4. Evaluation de l'effet des deux huiles essentielles sur le pourcentage d'éclosion des œufs :

Le pourcentage d'éclosion est le rapport du nombre d'œufs éclos sur le nombre des œufs pondus.

Pour ce test, nous avons opté pour les mêmes doses utilisées dans les tests contact précédents soit (0,25 ; 0,5 ; 1 et 2 µl d'HE/g de pois chiches).

Dix œufs frais âgés de 24 heures ont été introduits dans un bocal à raison de deux œufs par graine de pois chiches traitées aux huiles essentielles extraites de *R. eriocalyx* et *L. stoechas* pendant 24 heures.

Toutes les graines ont été ensuite retirées des bocaux. Celles portant les œufs ont été introduites dans des boîtes de pétri non traitées et suivies jusqu'à l'éclosion.

Le nombre d'œufs éclos a été compté à la loupe binoculaire pour déterminer le taux moyen d'œufs éclos en fonction des différentes doses utilisées.

#### 10.6. Expression des résultats :

##### 10.6.1. Correction de la mortalité des adultes :

Les mortalités relevées sont corrigées par la formule d'Abbott (1925)

$$\text{Formule d'Abbott: } MC\% = \frac{(M - M_t) \times 100}{(100 - M_t)}$$

**MC:** pourcentage de mortalité corrigée ;

**M :** pourcentage de mortalité moyenne d'insectes dans l'échantillon traité ;

**M<sub>t</sub> :** pourcentage de mortalité moyenne d'insectes dans l'échantillon témoin.

### 10.6.2. Détermination des temps létaux et des doses létales :

Selon **Finney (1971)**, les valeurs des temps létaux et des doses létales sont déduites à partir des tracés des droites de régression dans les courbes de l'évolution proportionnelle des probits en fonction du Log des doses.

➤ **Détermination des temps létaux 50 et 90 :**

Les temps létaux **50** et **90** représentent les temps au bout desquels on observe une mortalité de **50%** et **90%** de la population traitée, sous l'effet entrainé par le toxique à une concentration bien déterminée. Les **TL<sub>50</sub>** **TL<sub>90</sub>** sont fixés par les droites de régression des tests d'inhalation.

➤ **Détermination des doses létales 50 et 90 :**

Pour estimer l'efficacité de nos huiles essentielles, on a procédé au calcul des **DL<sub>50</sub>** et **DL<sub>90</sub>** qui représentent les concentrations de ces substances entrainant la mort de 50% et 90% d'individus d'un même lot respectivement.

### 10.6.3. Fécondité des femelles :

La fécondité des femelles a été estimée en comptant le nombre d'œufs pondus chaque 24 heures et a été établie en fonction du temps et des doses utilisées par rapport au test témoin.

Les résultats sont exprimés sous la forme: **moyenne ± écart-type** et ont été comparés au test témoin.

### 10.6.4. Pourcentage d'éclosion des œufs :

Le pourcentage d'éclosion des œufs est donné par la relation suivante :

$$FERTILITE (\%) = \frac{(E) \times 100}{(P)}$$

Où :

**E:** Nombre d'œufs éclos.

**P:** Nombre d'œufs pondus.

## **11. Analyse statistique :**

Les résultats de l'évaluation des activités antioxydante et insecticide des huiles essentielles et extraits des plantes étudiées, ont été soumis à une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA 2) avec un niveau de signification de 5% en utilisant le logiciel statistique **SPSS 18.0**.

**Pour l'activité antioxydante:** cette analyse a pour but de tester l'effet de l'antioxydant (huiles essentielles et extraits des feuilles) et de la concentration utilisée sur l'activité de piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur.

**Pour l'activité insecticide:** ces tests visent l'estimation de l'effet de l'huile essentielle et de sa dose sur la mortalité et la fécondité des adultes ainsi que sur la fertilité des œufs pondus.

Tous les graphes et histogrammes ont été réalisés en utilisant les logiciels **Microsoft Office 2007** et **SPSS 18.0**.

## *Chapitre 2 : Résultats et discussions*

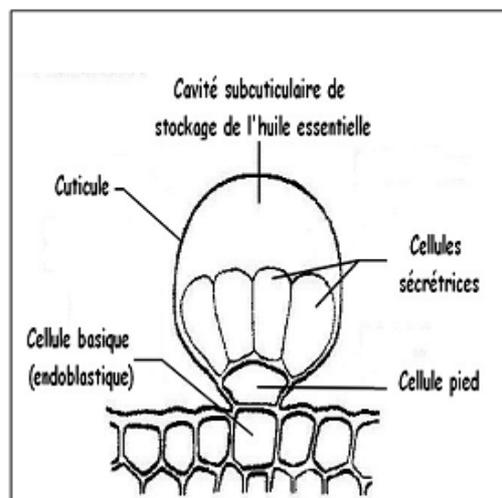
## 1. Localisation des sites producteurs des huiles essentielles:

L'observation des coupes histologiques effectuées sur les feuilles du romarin et de la lavande révèle la présence de poils glandulaires, tecteurs et sécréteurs représentées par les figures 35, 37, 38 et 39 et schématisées par les figures 36 et 40.

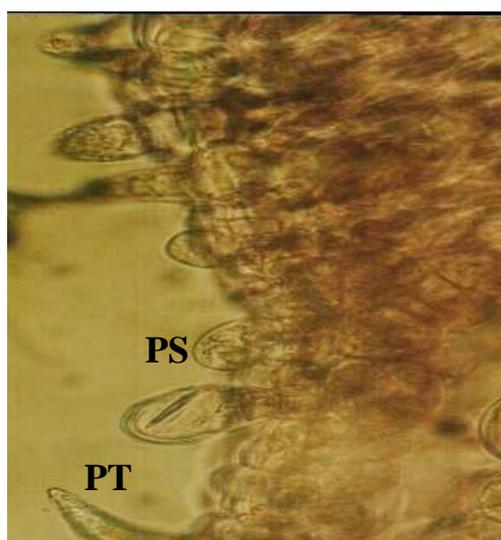
### 1.1. Cas du romarin:



**Figure 35:** Coupe transversale de la feuille de *R. eriocalyx* mettant en évidence un poil glandulaire (PG) (Gr.: X 160).



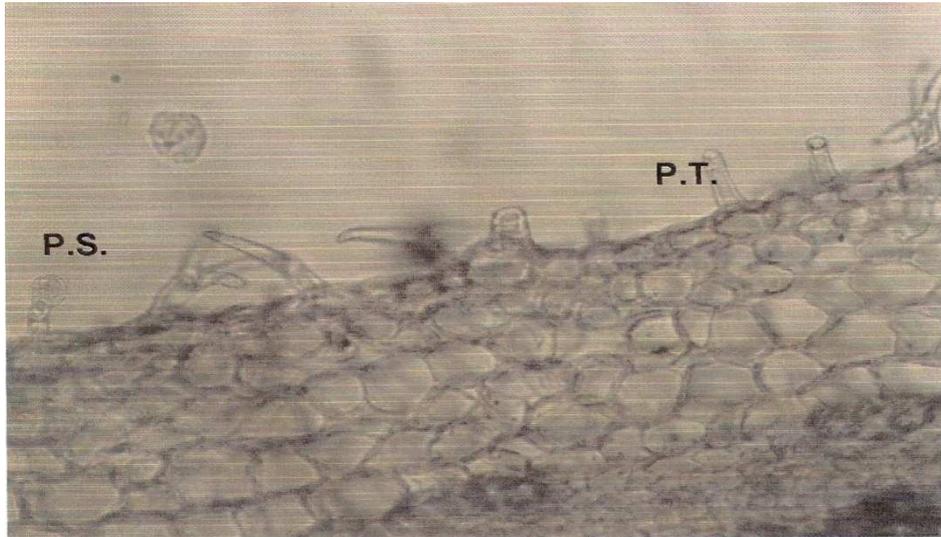
**Figure 36:** Schéma d'un poil glandulaire (Stahl-Biskup, 2002).



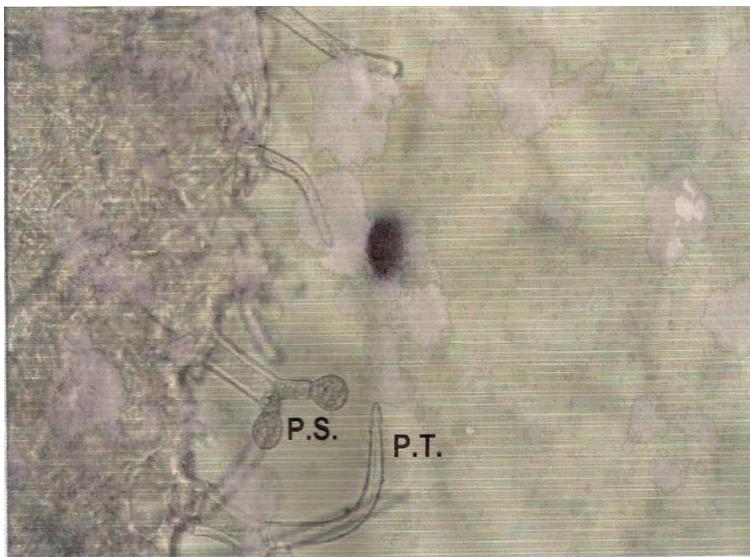
**Figure 37:** Coupe transversale de la feuille de *R. eriocalyx* mettant en évidence les poils tecteurs (PT) et sécréteurs (PS) (Gr.: X 160).

## 1.2. Cas de la lavande :

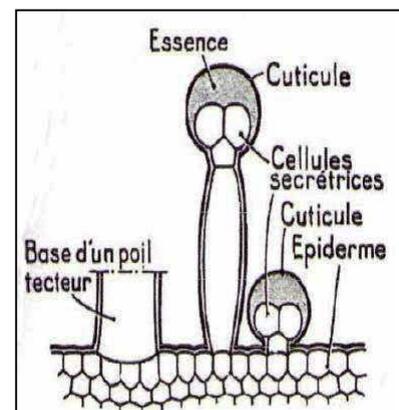
2.



**Figure 38:** Coupe transversale de la tige de *L. stoechas* mettant en évidence les poils tecteurs (PT) et sécréteurs (PS) (Gr.: X 80).



**Figure 39:** Coupe transversale d'une feuille de *L. stoechas* mettant en évidence les poils tecteurs (PT) et sécréteurs (PS) (Gr.: X 80).



**Figure 40:** Schéma d'un poil tecteur et sécréteur (Camefort, 1972).

Les photos des coupes réalisées sur les parties aériennes de *Rosmarinus eriocalyx* et de *Lavandula stoechas*, révèlent la présence des poils tecteurs, sécréteurs et glandulaires qui constituent les organes responsables de la synthèse, l'accumulation et la sécrétion des huiles essentielles.

L'organisation de ces structures sécrétrices est caractéristique de la famille des Lamiaceae.

Ces glandes épidermiques, de forme sphérique, constituent autant de petites usines de production d'huiles essentielles. Leur activité se traduit par la synthèse de tous les constituants des huiles essentielles et par leur stockage.

Le professeur **Johannes Novak** a précisé que la composition chimique des huiles essentielles contenues en cellules voisines (glandes d'huile) pourrait être variable mais que la composition typique d'huile essentielle particulière était en grande partie liée à la moyenne du nombre des cellules à huiles essentielles présentes dans la plante (**Novak, 2005**).

## **2. Rendements des extractions:**

### **2. 1. Cas de la Lavande:**

Les rendements en huile essentielle obtenus par hydrodistillation de quelques espèces de Lavande sont regroupés dans le tableau 7:

**Tableau 7:** Comparaison des rendements en huile essentielle de quelques espèces de lavande.

Espèce	Provenance	Rendement ml/100g de MVF
<i>L. stoechas</i>	Tizi-Ouzou <sup>(1)</sup>	0,16
	Oum el-Alou <sup>(2)</sup>	2,0
	Ouchba <sup>(3)</sup>	0,94
	Zarifet <sup>(3)</sup>	0,70
<i>L. intermedia</i>	Iowa, Norvège <sup>(4)</sup>	8,72
<i>L. angustifolia</i>	Iowa, Norvège <sup>(4)</sup>	2,70

(1) : Echantillon étudié ; (2) : (Mohammedi, 2006) ; (3) : (Sidi Boulenouar et Ziane, 2003) ; (4) : (Maria, 2002).

En ce qui concerne l'échantillon étudié, le rendement enregistré **0,16%** est faible par rapport aux autres échantillons de la même espèce mais issus d'autres régions géographiques dont les rendements varient entre **0,70 à 2,0%**.

Ce résultat pourrait être attribué au stade de récolte de la plante qui a eu lieu au début de floraison.

De même, cette différence de rendement est observée en comparant ce résultat avec ceux obtenus en utilisant d'autres espèces du même genre botanique *L. intermedia* et *L. angustifolia* et qui ont fourni des rendements plus élevés (**8,70 et 2,70 %** respectivement).

Tous ces résultats confirment la variabilité du rendement en huile essentielle des plantes aromatiques suivant l'espèce et la distribution géographique.

## 2.2. Cas du romarin :

Le tableau 8 reporte les rendements en huile essentielle de quelques échantillons de romarin :

**Tableau 8:** Rendements en huile essentielle de deux espèces de romarin.

Espèce	Provenance	Rendement ml/100g de MVF
<i>R. eriocalyx</i>	Tablat <sup>(1)</sup>	1,6
	Tafoughalt, Maroc <sup>(2)</sup>	1,21
<i>R. officinalis</i>	Tablat <sup>(3)</sup>	0,89
	Bibans <sup>(4)</sup>	1,5
	ENSA El-Harrach <sup>(5)</sup>	1,8

**(1):** Echantillon étudié; **(2):** (Fadel et al., 2010); **(3):** (Outaleb, 2009); **(4):** (Boutekedjiret et al., 1998; Sahraoui et al., 2007); **(5):** (Makhlouf, 2002).

D'après les résultats du tableau 8, le rendement obtenu à partir de l'échantillon étudié **1,6 ml/100g de MVF** est parmi les plus élevés.

Cependant, ce dernier présente une différence avec celui de la même espèce mais originaire du Maroc qui est de **1,21 ml/100g de MVF**. Ainsi à travers les résultats obtenus, la variabilité du rendement en huile essentielle de l'espèce *R. eriocalyx* pour des régions géographiques différentes est facilement détectée.

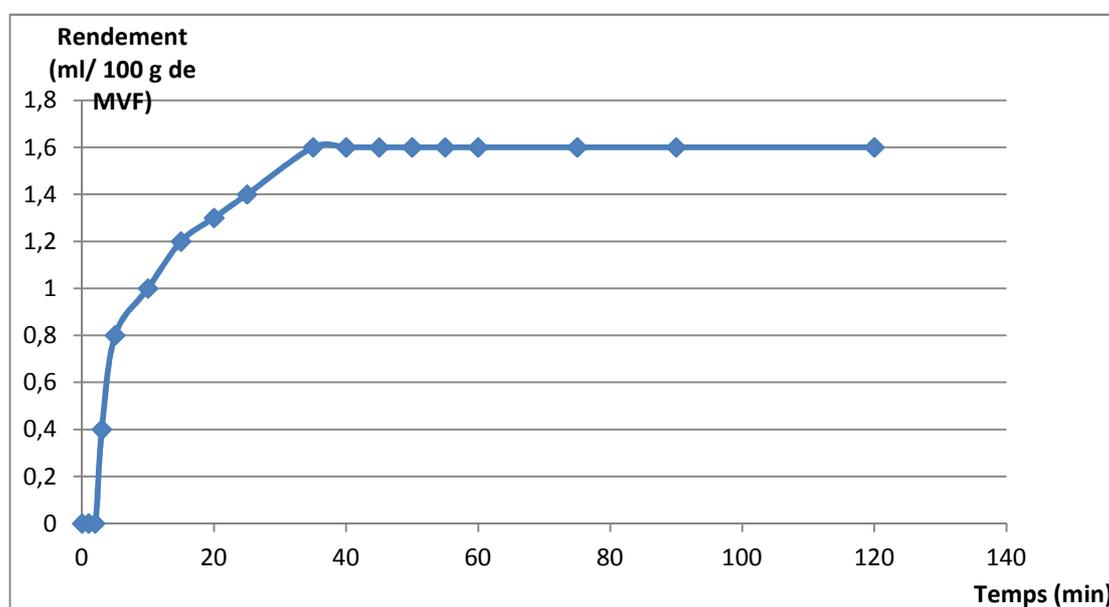
Ces rendements sont relativement proches de ceux obtenus à partir d'une autre espèce de romarin « *R. officinalis* », issus de différentes régions et qui varient entre **0,89 et 1,8 ml/100g de MVF**.

### 3. Cinétique d'extraction des huiles essentielles :

La cinétique d'extraction de l'huile essentielle de l'espèce *Lavandula stoechas* n'a pas été faite vue son très faible rendement.

Pour *R. eriocalyx*, l'étude de la cinétique d'extraction a été faite dans le but de suivre l'évolution du rendement en huile essentielle en fonction de la durée d'extraction. Pour cela, 50 g de matière végétale fraîche ont été soumis à une extraction par hydrodistillation pendant 120 minutes, le volume de l'huile essentielle récupérée a été noté à des intervalles de temps plus ou moins réguliers.

Les résultats de cette étude sont regroupés dans et la figure 41:



**Figure 41:** Evolution du rendement en huile essentielle de *Rosmarinus eriocalyx* en fonction du temps.

La courbe de la cinétique d'extraction est typique pour une hydrodistillation des HE à partir des plantes aromatiques et vérifie le mécanisme proposé pour leurs extractions.

Le mécanisme de l'extraction par hydrodistillation est lié à l'anatomie des feuilles et fleurs de *Rosmarinus eriocalyx*.

Après le temps de chauffage, on peut distinguer trois phases de distillation:

➤ **Phase 1: (de 0 à 15 min):** durant cette phase le rendement en huile essentielle augmente rapidement permettant ainsi de récupérer **75 ml/100g de MVF** de l'huile essentielle.

Les feuilles et fleurs du romarin, renferment des trichomes glandulaires responsables de la sécrétion de l'huile essentielle qui peuvent jouer le rôle de réservoirs d'huile essentielle.

Ces structures histologiques ont été en partie détruites sous l'effet du chauffage, libérant ainsi l'huile essentielle vers la surface des particules végétales. Cette huile essentielle a été libérée rapidement durant une phase d'initiation relativement courte (**15 minutes**).

Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les poils sécréteurs d'huile essentielle présents au niveau de la feuille et de fleur sont exogènes facilitant ainsi l'extraction de l'huile essentielle.

➤ **Phase 2: (de 15 à 35 min) :** durant cette phase, le rendement augmente lentement avec l'avancement du processus d'hydrodistillation pour atteindre son maximum de **1,6 ml à 35 min.**

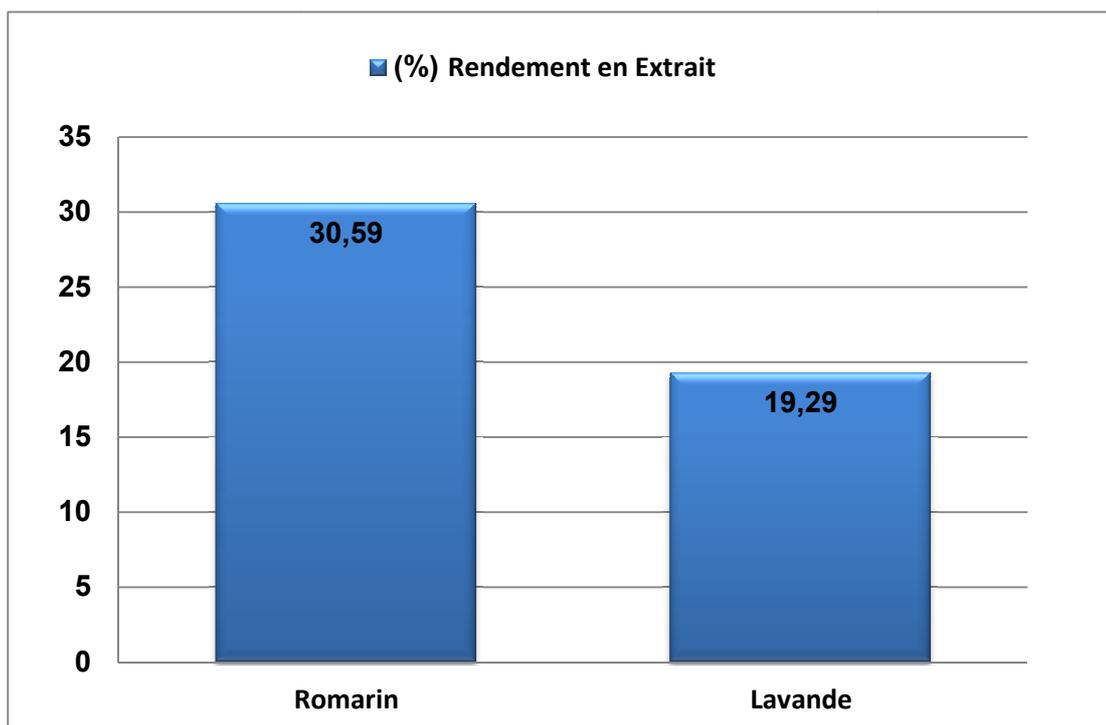
Durant la deuxième phase, l'huile essentielle contenue dans les poils glandulaires (réservoirs) non détruits sous l'effet du chauffage diffuse lentement vers la surface des particules végétales. Ceci explique le ralentissement du processus d'extraction au cours de cette phase.

➤ **Phase 3: (de 35 à 120 min) :** la courbe prend une forme presque rectiligne et le rendement n'augmente plus, indiquant ainsi l'épuisement de la totalité de l'huile essentielle contenue dans la plante.

#### 4. Rendements en extrait éthanolique :

L'extrait éthanolique récupéré après évaporation à sec et sous pression réduite a été pesé pour déterminer le poids sec résultant, cet extrait renferme les composés phénoliques et les flavonoïdes.

La figure 42 représente les rendements en extraits exprimés en (g extrait/100g de matière végétale) obtenus pour les deux plantes étudiées.



**Figure 42:** Rendement en extrait éthanolique des deux plantes étudiées.

#### 4.1.Cas de la lavande:

Le rendement en extrait de *L. stoechas* est reporté dans le tableau 9:

**Tableau 9:** Rendement en extrait sec de deux échantillons de *Lavandula stoechas*

Espèces	Provenance	Rendement en extrait (%)
<i>Lavandula stoechas L.</i>	Tizi-Ouzou <sup>(1)</sup>	19,29
<i>Lavandula stoechas L.</i>	Erzurum -Turquie <sup>(2)</sup>	9,4

(1) : Echantillon étudié ; (2) : (Giray et al., 2008).

D'après le tableau ci-dessus on constate que le rendement d'extraction obtenu à partir de l'échantillon étudié est supérieur à celui obtenu à partir de la même espèce originaire de Turquie.

Le rendement en extrait peut varier au sein de la même espèce en fonction de l'origine, de la période de récolte de la plante, de la méthode d'extraction ainsi que des conditions sous lesquelles cette dernière a été effectuée.

#### 4.2.Cas du romarin :

Les rendements d'extraction de l'huile essentielle de deux espèces de romarin sont regroupés dans le tableau 10:

**Tableau 10:** Rendement en extrait sec de deux espèces de romarin:

Espèces	Provenance	Rendement en extrait %
<i>Rosmarinus eriocalyx</i>	Tablat <sup>(1)</sup>	30,59
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Tablat <sup>(2)</sup>	20,55
<i>Rosmarinus officinalis</i>	El Harrach Alger <sup>(3)</sup>	39,6

(1) : Echantillon étudié ; (2) et (3) : (Outaleb, 2009)

On remarque que l'échantillon de *R. eriocalyx* étudié possède un rendement plus élevé en extrait sec (**30,59%**) par rapport au *R. officinalis* originaire de la même région (**20,55%**), cette différence pourrait être attribuée à la nature de l'espèce.

De même, une différence notable en termes de rendement en extrait est observée entre l'échantillon de *R. officinalis* de Tablat et celui de la même espèce mais provenant d'Alger qui sont de **20,55 et 39,6%** respectivement.

En général, il est difficile de comparer les résultats avec ceux cités dans la littérature à cause de la grande variabilité des facteurs extrinsèques, tels que les techniques d'extraction et les solvants utilisés.

D'après (**Hayouni et al., 2007**), la nature de la matière première utilisée détermine la différence entre les rendements des extraits obtenus par deux méthodes d'extraction, et non pas le solvant de l'extraction..

## **5. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques des huiles essentielles :**

### **5.1. Huile essentielle de *L. stoechas* :**

Les propriétés physico-chimiques et organoleptiques de l'huile essentielle de *L. stoechas* sont rassemblées dans le tableau 11:

**Tableau 11:** Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de l'huile essentielle de *L. stoechas*:

Caractéristiques	Huile essentielle		
	Echantillon étudié	Guenther (1974)	
Organoleptiques	Aspect	Liquide	Liquide
	Couleur	Jaune claire	Jaune claire
	Odeur	Camphrée	Même odeur que les sommités fleuries
Physiques	Densité relative à 20°C	0,937	0,949
	Indice de réfraction à 20°C	1,478	1,468-1,482

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'huile essentielle de *L. stoechas* présente des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques proches de celles indiquées dans la littérature.

### 5.2. Huile essentielle de *R. eriocalyx*:

Le tableau 12 résume les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de l'huile essentielle de *R. eriocalyx*:

**Tableau 12:** Propriétés organoleptiques et physiques de l'huile essentielle de *R. eriocalyx*

Caractéristiques	Huile essentielle			
	Echantillon étudié	Outaleb, 2009	AFNOR	
<b>Organoleptiques</b>	<b>Aspect</b>	Liquide mobile	Liquide mobile	Liquide mobile
	<b>Couleur</b>	Jaune pâle	Jaune pâle	Presque incolore à jaune pâle
	<b>Odeur</b>	Caractéristique aromatique camphrée	Caractéristique aromatique camphrée	Caractéristique aromatique plus ou moins camphrée
<b>Physiques</b>	<b>Densité relative à 20°C</b>	0,874	0,893	0,860-0,920
	<b>Indice de réfraction à 20°C</b>	1,471	1,475	1,466-1,475

En général, les propriétés de l'huile essentielle obtenue, sont comparables à celles de l'échantillon issu de *R. officinalis* de même provenance (Tablat), ainsi que celles indiquées par L'Association Française de Normalisation.

## 6. Caractérisation des huiles essentielles:

### 6.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *L. stoechas*:

La composition chimique de l'huile essentielle de *L. stoechas* de Tizi-Ouzou a été établie par Chromatographie en Phase Gazeuse seule (CPG) et par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse (CPG/SM)

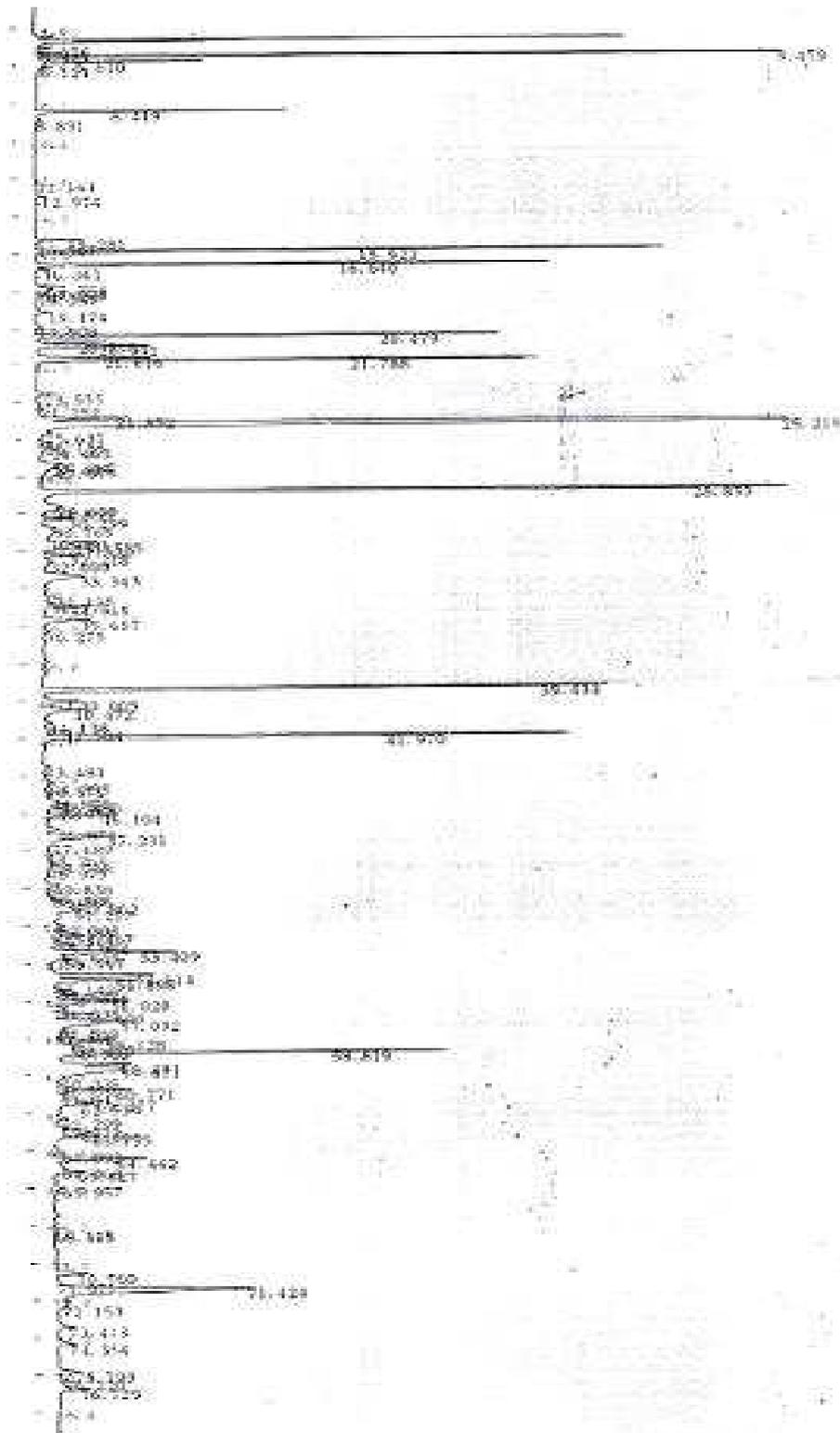
Le tableau 13 et les figures 43-45 représentent la composition chimique de l'huile essentielle de *L. stoechas*.

**Tableau 13:** Composition chimique de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de *Lavandula stoechas*.

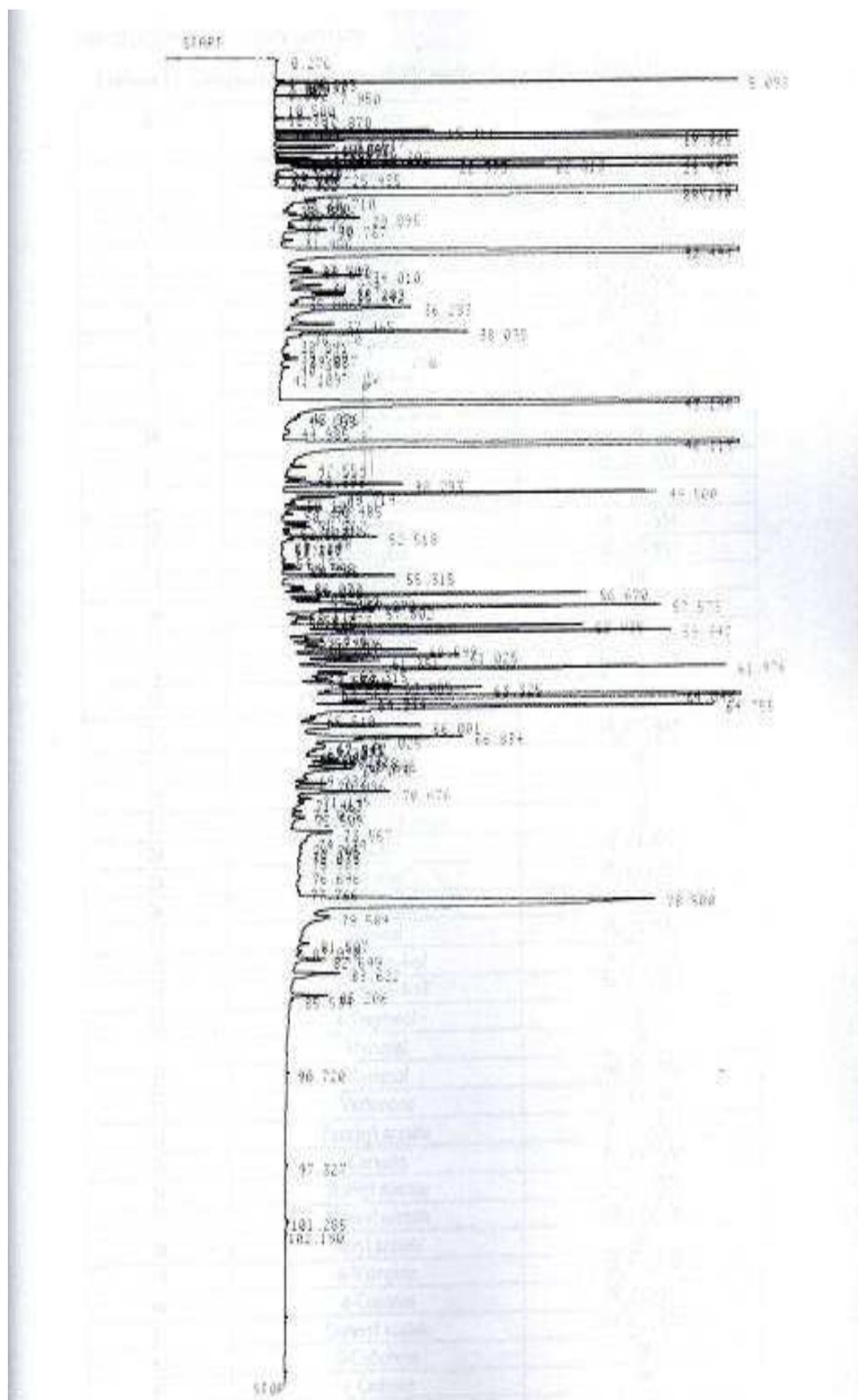
N°	Composés <sup>1</sup>	IK <sup>2</sup>	%	Identification <sup>3</sup>
1	Tricyclène	919	0,6	SM-IR
2	$\alpha$ -Pinène	926	2,8	SM-IR
3	Camphène	957	2,5	SM-IR
4	t- Butylbenzene	962	0,9	SM-IR
5	$\delta$ -3-Carène	1017	3,3	SM-IR
6	p- Cymène	1025	1,2	SM-IR
7	<b>1,8 - Cinéole</b>	<b>1028</b>	<b>4,9</b>	SM-IR
8	$\gamma$ -Terpinène	1058	0,25	SM-IR
9	<b>Fenchone</b>	<b>1075</b>	<b>11</b>	SM-IR
10	Fenchol	1106	1,3	SM-IR
11	<b>Camphre</b>	<b>1122</b>	<b>6,85</b>	SM-IR
12	Bornéol	1180	1	SM-IR
13	Terpinène 4-ol	1182	0,55	SM-IR
14	p-Cymène-8-ol	1183	2,1	SM-IR
15	Myrténol	1190	1	SM-IR

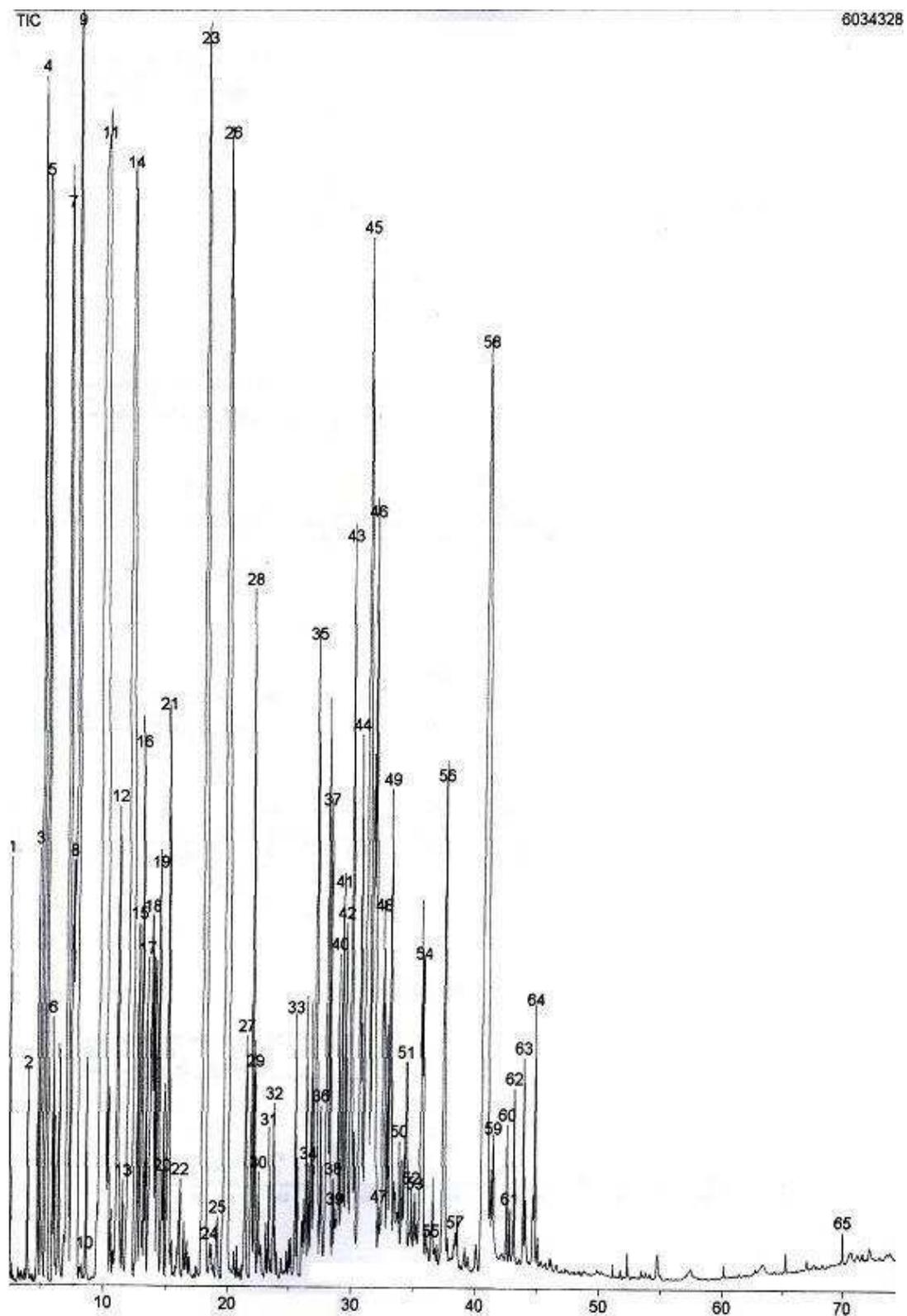
16	Verbenéone	1202	0,45	SM-IR
17	Fenchyl acétate	1208	1,1	SM-IR
18	Carvone	1210	0,3	SM-IR
19	<b>Bornyl acétate</b>	<b>1278</b>	<b>6,3</b>	SM-IR
20	<b>Sabinyl acétate</b>	<b>1295</b>	<b>6,2</b>	SM-IR
21	$\alpha$ - Ylangène	1350	0,65	SM-IR
22	$\alpha$ - Copaène	1353	1,25	SM-IR
23	Geranyl acétate	1365	0,55	SM-IR
24	Sativène	1396	0,25	SM-IR
25	$\beta$ - Caryophyllène	1438	0,4	SM-IR
26	$\alpha$ -Humulène	1472	0,6	SM-IR
27	$\delta$ -Cadinène	1531	2,7	SM-IR
28	Spathulénol	1602	0,3	SM-IR
29	(E) –Nerolidol	1609	2	SM-IR
Composés identifiés (%)		<b>63,30</b>		
Monoterpènes		10,65		
Monoterpènes oxygénés		43,05		
Sesquiterpènes		5,85		
Sesquiterpènes oxygénés		2,85		
Autres		0,9		

<sup>[1]</sup>: Composés classés dans l'ordre d'élution sur la colonne OV-1 ; <sup>[2]</sup>: indice de rétention relatif aux n-alcanes C<sub>9</sub>-C<sub>23</sub> ; <sup>[3]</sup>: **SM**, comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; **IR**, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique à celle que nous avons utilisée.



**Figure 43:** Chromatogramme CPG de l'huile essentielle de *L. stoechas* sur colonne DB-5

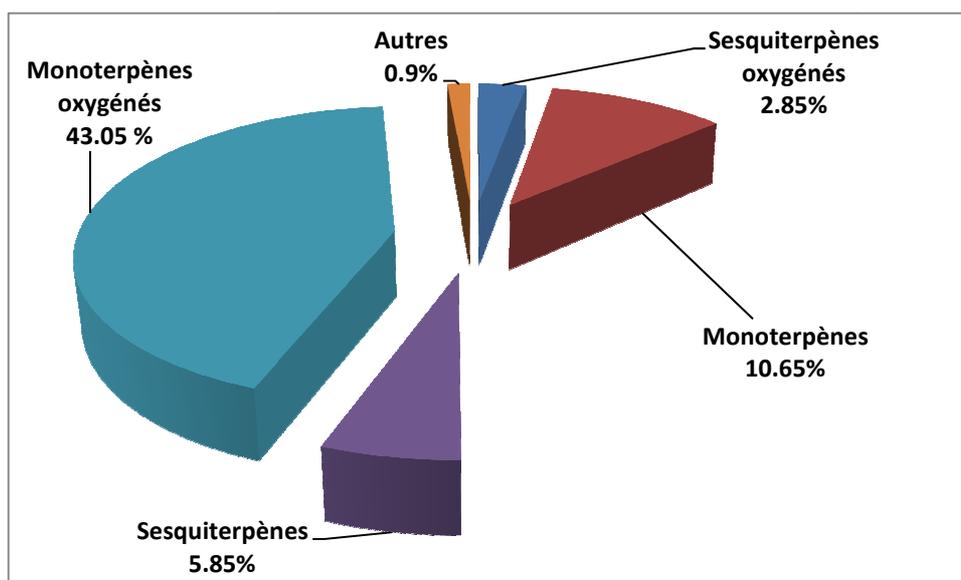




**Figure 45:** Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle de *L. stoechas* sur colonne OV-1

L'analyse par CPG et CPG/SM de l'huile essentielle de *L. stoechas* a révélé la présence de 29 composés représentant 63,70% de la totalité des pics.

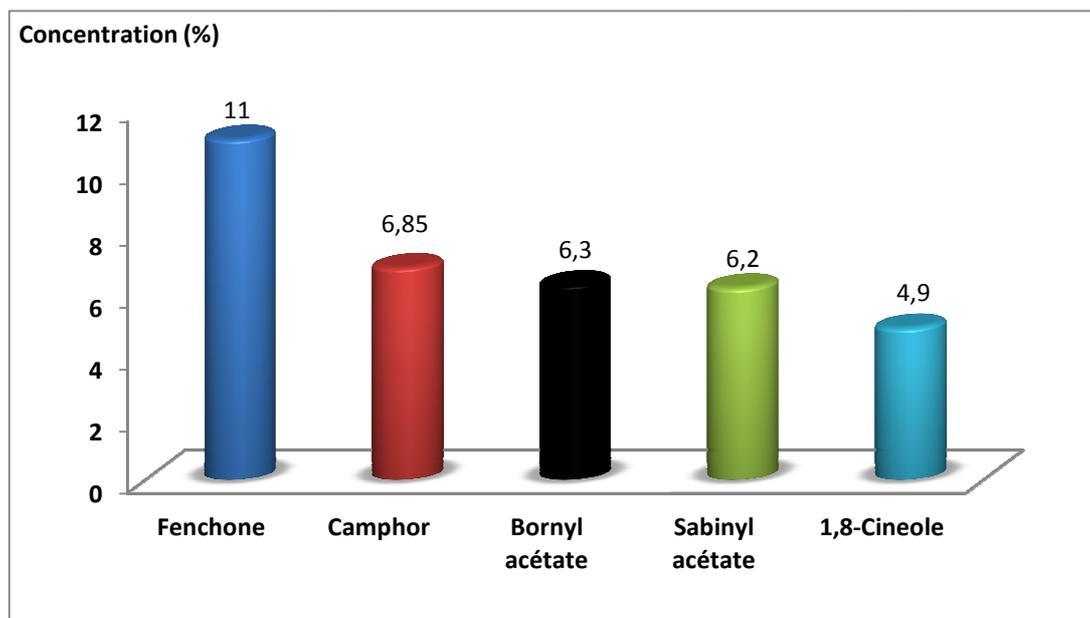
Nous remarquons une prédominance des monoterpènes oxygénés qui représentent 43,05% des composés identifiés avec les hydrocarbures monoterpéniques avec une teneur de 10,65%.



**Figure 46:** Familles chimiques de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas*

La richesse de cette huile essentielle en composés oxygénés semble être intéressante car ces derniers, déterminent les caractéristiques olfactives et aromatiques de l'huile.

Les principaux constituants sont: fenchone (11%), camphre (6,85%), bornyl acétate (6,3%), sabinyl acétate (6,2%) et le 1,8-cineol (4,9%). Ces teneurs sont regroupées dans la figure 47.



**Figure 47:** Principaux composés majoritaires de l'huile essentielle de *L. stoechas*

Ces proportions peuvent subir de larges variations au sein de l'espèce en fonction de la région géographique, la période de récolte ainsi que des techniques culturelles utilisées.

Ainsi, cette huile est de chémotype **fenchone/camphre** ; la dominance de ces deux composés est souvent rencontrée chez cette espèce mais à des concentrations plus importantes qui peuvent atteindre **75,5%** pour le fenchone et **56%** pour le camphre (**Ristorcelli et al., 1998**).

Une comparaison des teneurs en composés principaux des huiles essentielles extraites de *L. stoechas* et provenant de différentes régions géographiques est reportée dans le tableau 14:

**Tableau 14:** Teneurs en composés majoritaires de quelques échantillons de *L. stoechas*.

Echantillon	Origine de <i>Lavandula stoechas</i>			
	Algérie <sup>(1)</sup>	Algérie <sup>(2)</sup>	Turquie <sup>(3)</sup>	Grèce <sup>(4)</sup>
Fenchone (%)	11	27,6	32,03	45,19
Camphre (%)	6,85	18,1	14,71	9,90
Bornyl acétate (%)	6,3	3,2	1,68	-
Sabinyl acétate (%)	6,2	-	-	-
1,8-Cinéole (%)	4,9	18,9	7,67	16,30

(1) : Echantillon étudié ; (2) : (Mohammedi, 2006); (3) : (Giray et al., 2008); (4) : (Hassiotis, 2010).

Le tableau 14 indique les mêmes composés majoritaires pour tous les échantillons. Cependant, les teneurs en fenchone, camphre et 1,8-cinéol de l'huile essentielle de l'échantillon étudié sont beaucoup plus faibles que celles citées dans la littérature.

Néanmoins, les proportions du bornyl acétate (6,3%) et du sabinyl acétate (6,2%) sont élevées par rapport aux autres huiles où ces composés ne représentent que des faibles proportions de la totalité des constituants.

## 6.2. Huile essentielle de *R. eriocalyx* :

Les résultats de l'analyse chromatographique par CPG/SM de l'huile essentielle du romarin sont représentés dans le tableau 15 et les chromatogrammes sur les figures 48,49 et 50:

**Tableau 15:** Composition chimique de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de *Rosmarinus eriocalyx*

N°	Composés <sup>1</sup>	IK <sup>2</sup>		Concentration (%)	Identification <sup>3</sup>
		HP5 MS	Stabilwax <sup>TM</sup>		
1	Tricyclène	923	1017	1,2	SM-IR
2	<b><math>\alpha</math>-Pinène</b>	<b>935</b>	<b>1026</b>	<b>10,4</b>	SM-IR
3	<b>Camphène</b>	<b>948</b>	<b>1072</b>	<b>9,6</b>	<b>SM-IR</b>
4	Verbenène	953	1121	0,1	SM-IR
5	$\beta$ -Pinène	976	1119	2,7	SM-IR
6	1-Octen-3-ol	982	1411	t	SM-IR
7	$\beta$ -Myrcène	992	1173	0,9	SM-IR
8	$\alpha$ -Phellandrène	1005	1177	0,8	SM-IR
9	$\alpha$ -Terpinène	1017	1192	1,2	SM-IR
10	<b>p-Cymène + Limonène</b>	<b>1027</b>	<b>1026</b>	<b>11,0</b>	<b>SM-IR</b>
11	1,8-Cinéole	1033	1223	4,0	SM-IR
12	cis- $\beta$ -Ocimène	1039	1246	0,3	SM-IR
13	trans- $\beta$ -Ocimène	1048	1272	t	SM-IR
14	$\gamma$ -Terpinène	1061	1261	0,8	SM-IR
15	Terpinolène	1087	1300	0,5	SM-IR

16	<b>Camphre</b>	<b>1144</b>	<b>1556</b>	<b>39,4</b>	<b>SM-IR</b>
17	Bornéol	1167	1732	3,5	SM-IR
18	4-Terpinéol	1177	1613	1,7	SM-IR
19	$\alpha$ -Terpinéol	1194	1723	2,1	SM-IR
20	Myrténol	1198	1804	0,1	SM-IR
21	Bornyl acétate	1285	1608	0,6	SM-IR
22	$\alpha$ -Ylangène	1370	1491	0,1	SM-IR
23	$\alpha$ -Copaène	1372	1509	0,5	SM-IR
24	$\beta$ -Caryophyllène	1415	1612	2,4	SM-IR
25	$\beta$ -Gurjunène	1426	1532	t	SM-IR
26	Aromadendrène	1437	1663	t	SM-IR
27	$\alpha$ -Humulène	1450	1687	0,5	SM-IR
28	trans-beta-Farnesène	1456	1641	t	SM-IR
29	allo-Aromadendrène	1457	1663	0,1	SM-IR
30	$\alpha$ -Selinène	1490	1490	0,1	SM-IR
31	$\alpha$ -Muuroolène	1495	1740	0,2	SM-IR
32	$\gamma$ -Cadinène	1511	1776	0,4	SM-IR
33	$\delta$ -Cadinène	1518	1772	1,0	SM-IR
34	Cadina-1,4-diène	1526	1757	0,1	SM-IR
35	$\alpha$ -Calacorène	1535	1941	0,1	SM-IR
36	Caryophyllène oxyde	1573	2014	0,3	SM-IR
37	Caryophylladiénol	1628	2290	0,1	SM-IR
38	T-Cadinol	1635	2198	0,1	SM-IR
39	$\alpha$ -Cadinol	1650	2259	0,1	SM-IR
40	Methyl jasmonate	1657	2320	0,1	SM-IR
41	$\alpha$ -Bisabolol	1680	2216	0,9	SM-IR

---

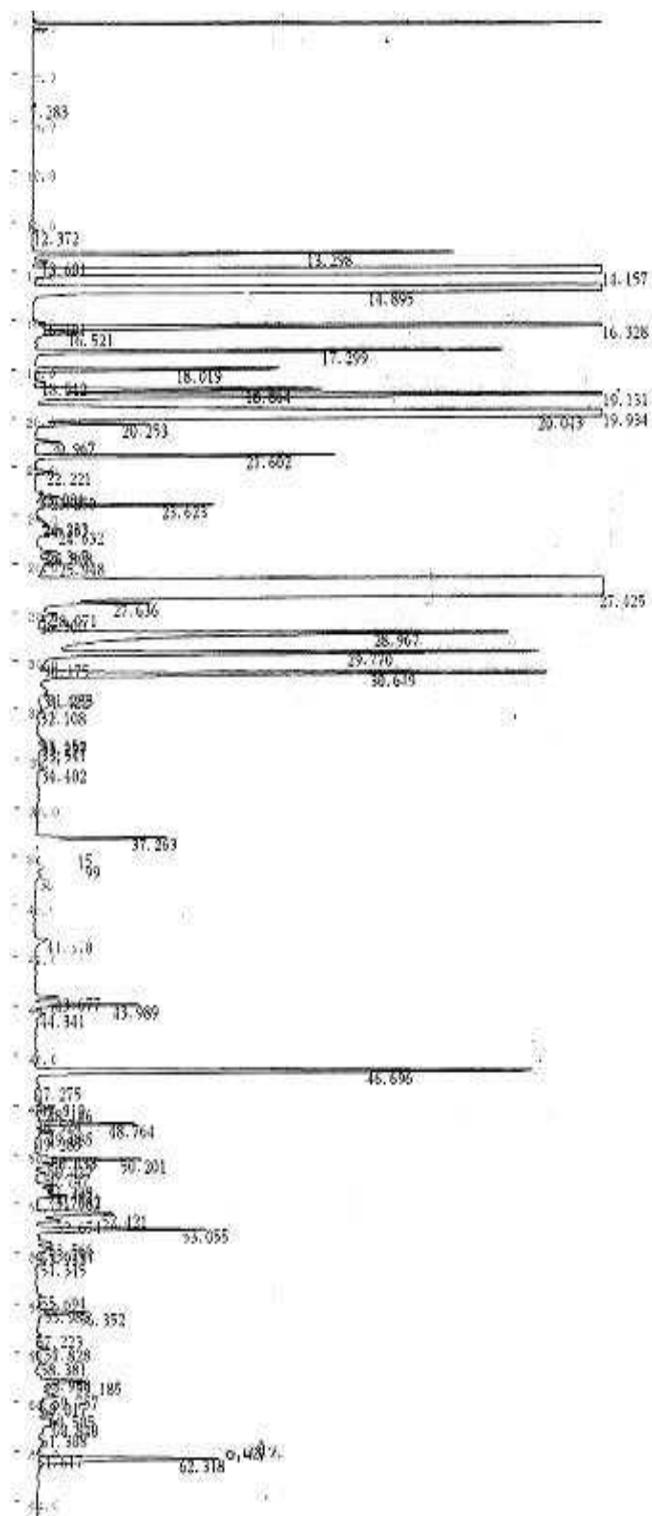
<b>Composés identifiés (%)</b>	<b>98,1</b>
Monoterpènes	<b>39,5</b>
Monoterpènes oxygénés	<b>51,4</b>
Sesquiterpènes	<b>5,5</b>
Sesquiterpènes oxygénés	<b>1,5</b>
Autres	<b>0,1</b>

---

<sup>1</sup> composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne apolaire DB1 ; <sup>2</sup> indice de rétention relatif aux n-alcanes C<sub>9</sub>-C<sub>23</sub> ; <sup>3</sup> Identification : **SM**, comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; **IR**, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique à celle que nous avons utilisée; **t** : trace (<0,05%).

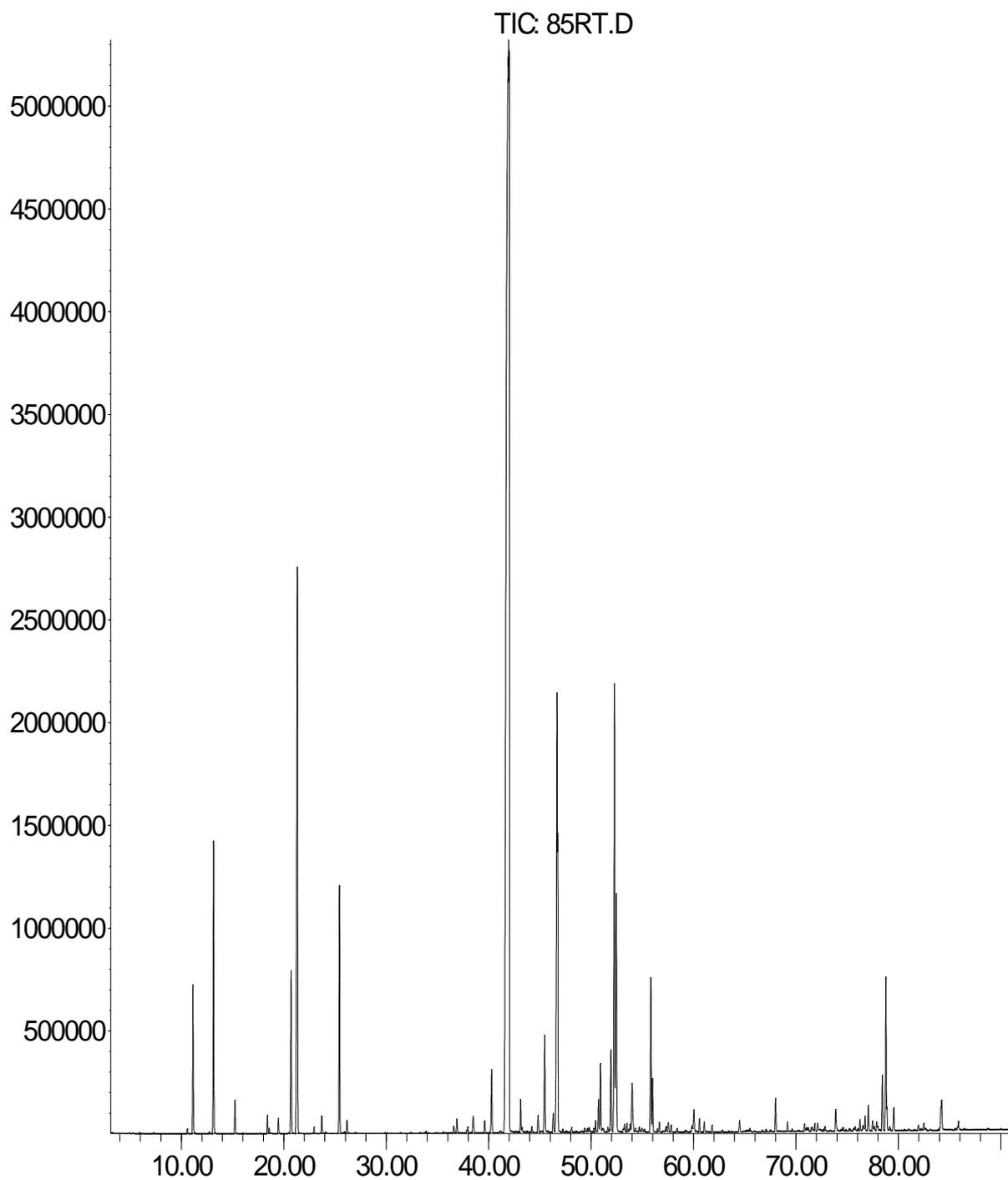
L'analyse par CPG/SM de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles de *Rosmarinus eriocalyx* a permis d'identifier 41 composés qui représentent **98,1%** de la totalité des pics.

Nous remarquons que cette huile présente une dominance des monoterpènes oxygénés qui constituent **51,4%** suivis par les hydrocarbures monoterpéniques avec une teneur de **39,5%**.



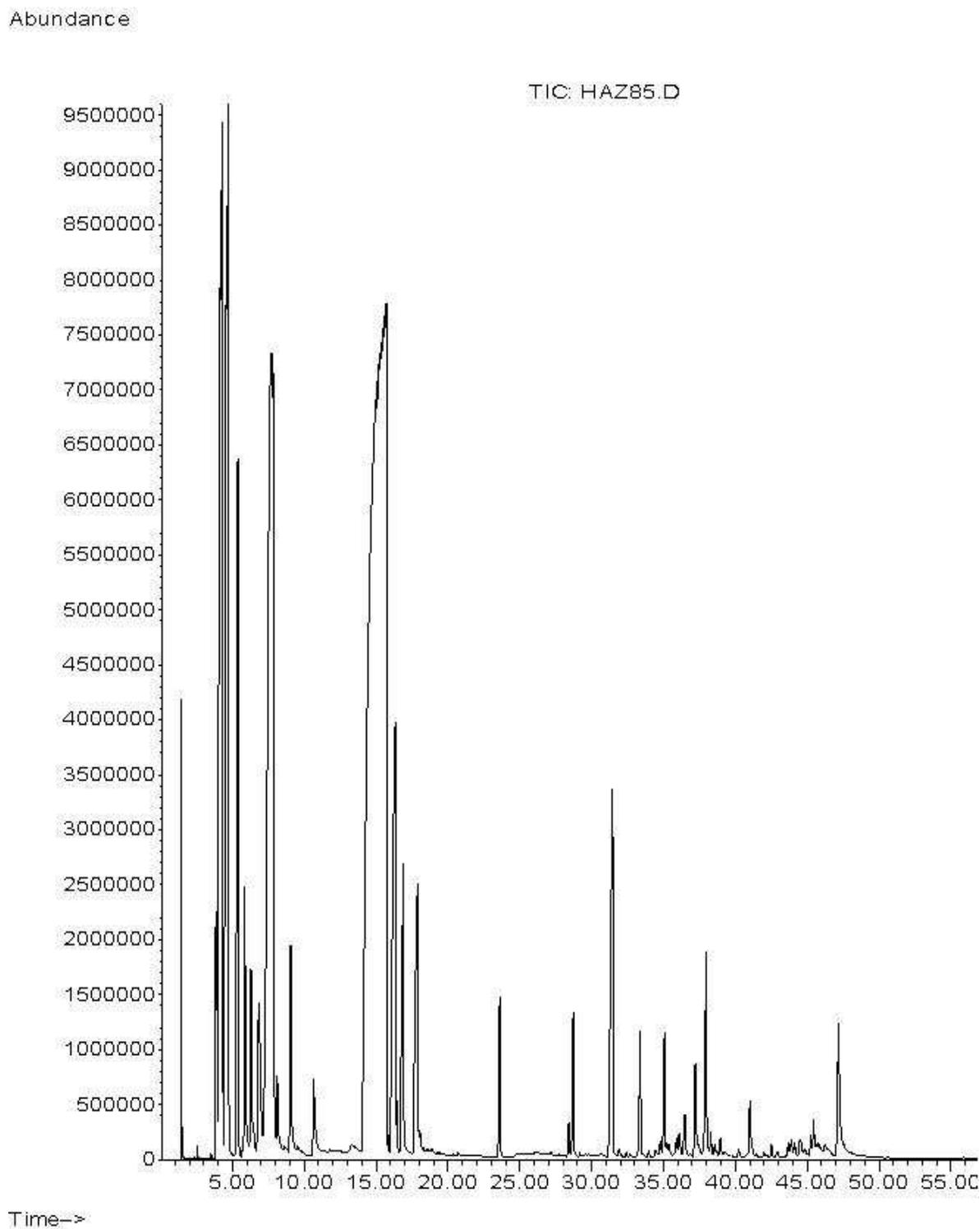
**Figure 48:** Chromatogramme de CPG de l'huile essentielle de *R. erioacalyx* sur colonne DB-5

Abundance

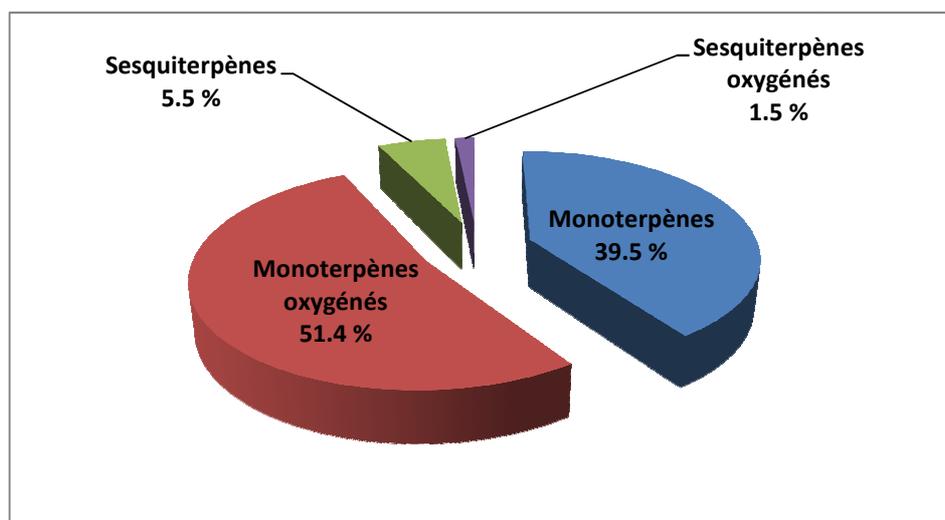


Time→

**Figure 49:** Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle de *R. eriocalyx* sur colonne polaire Stabilwax<sup>TM</sup>



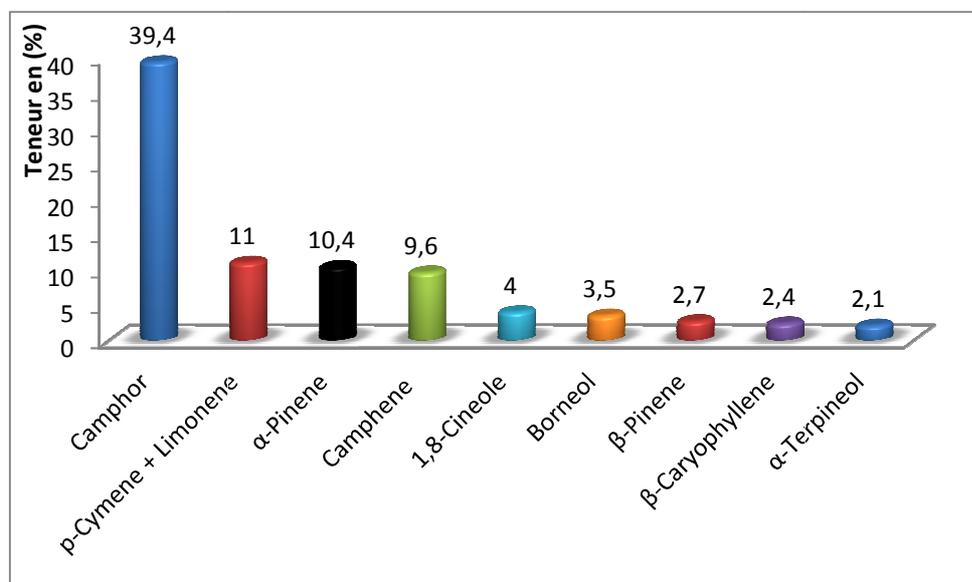
**Figure 50:** Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle de *R. eriocalyx* sur colonne non polaire HP5-MS.



**Figure 51:** Familles des composés identifiés de l'huile essentielle de *Rosmarinus eriocalyx*

Ces proportions sont significativement importantes comparées à celles trouvées pour l'huile essentielle de *R. eriocalyx* originaire du Maroc, pour laquelle les monoterpènes représentent la majorité des pics identifiés avec **39,04%** suivis des monoterpènes oxygénés (**12,36%**) (Fadel et al., 2010).

La figure 52 représente les composés majoritaires de l'huile essentielle du *R. eriocalyx* et leurs concentrations:



**Figure 52:** Principaux composés majoritaires de l'huile essentielle de *R. eriocalyx*.

Cette analyse montre que le camphre est le principal composé de cette huile avec 39,4% suivi du p-cymène + limonène (11%); de l' $\alpha$ -pinène (10,4%) et du camphène (9,6%).

L'huile essentielle de *Rosmarinus eriocalyx* contient les mêmes composés que celle de *R. officinalis* provenant de la même région géographique, et ne diffère que par la teneur de ces derniers.

La camphre constitue le principal composé majoritaire des huiles essentielles de *R. eriocalyx* et *R. officinalis* avec des teneurs de **39,4 et 32%** respectivement ; de même les autres composés majoritaires présentent des différences en termes de concentration pour les deux huiles:  $\alpha$ -pinène (**10,4 et 20,9%**) ; camphène (**9,6 et 22%**) ; et le 1,8 cinéol (**4 et 9,5%**) respectivement.

Le tableau 16 illustre les constituants principaux des huiles essentielles de *R. eriocalyx* provenant d'Algérie et du Maroc.

**Tableau 16:** Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles de quelques échantillons de *R. eriocalyx* :

Composés	Provenance	
	Algérie <sup>(1)</sup>	Maroc <sup>(2)</sup>
<b>Camphre (%)</b>	39,4	37
<b><math>\alpha</math>-pinène (%)</b>	10,4	18,2
<b>Camphène (%)</b>	9,6	20
<b>1,8-cinéole (%)</b>	4	11,4

(1): Echantillon étudié ; (2): (Fadel et al., 2010).

En général, la composition chimique de l'huile essentielle de *R. eriocalyx* reste dominée par le **camphre** avec des pourcentages entre 37 et 39,4%.

Toutefois, les concentrations des autres constituants principaux de l'huile étudiée sont relativement faibles par rapport à l'enregistrement de celles des autres échantillons.

## **7. Composition chimique des extraits éthanoliques:**

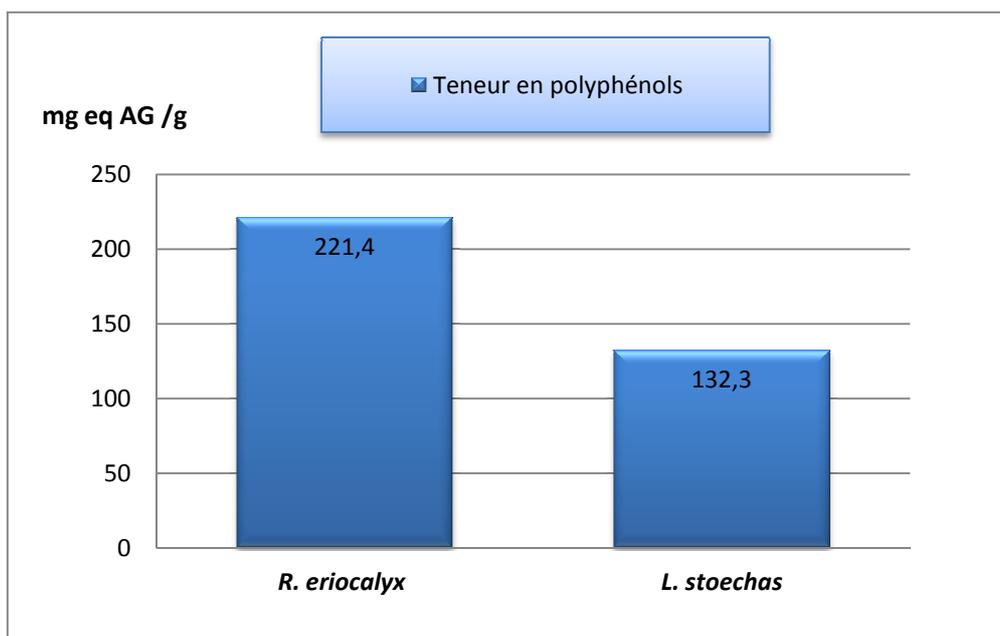
Les extraits éthanoliques des feuilles ont été soumis à une étude quantitative au moyen de techniques spectrophotométriques dans le but de déterminer leur teneur en phénols et en flavonoïdes. Pour cela nous avons établi deux courbes d'étalonnage réalisées avec l'acide gallique et la quercétine, pour le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes respectivement.

Les quantités des polyphénols et flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent gramme de l'étalon utilisé et déterminées par les deux équations de type:  $y = a x + b$ .

### **7.1. Phénols totaux :**

La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir des valeurs des absorbances à une longueur d'onde de 765 nm en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La figure 53 montre les teneurs en phénols totaux des extraits du romarin et de la lavande.



**Figure 53:** Teneurs en phénols totaux des deux espèces étudiées

On remarque que l'extrait issu du romarin est plus riche en composés phénoliques par rapport à celui de *L. stoechas*, ceci pourrait lui attribuer une plus forte activité antioxydante et insecticide.

La quantité des composés phénoliques des extraits éthanoliques des plantes étudiées dépend essentiellement: de leur origine, de la méthode d'extraction utilisée, de la nature du solvant et du matériel végétal (**Ebrahimzadeh et al., 2008**).

Ainsi, l'utilisation des solvants polaires conduit à une teneur élevée en composés phénoliques (**Hayouni, 2007**).

➤ **Extrait de *R. eriocalyx* :**

Le tableau 17 rapporte les teneurs en polyphénols des différents échantillons de romarin:

**Tableau 17:** Teneurs en polyphénols des extraits de deux espèces de romarin.

Espèces	Provenance	Teneur en polyphénols mg eq AG/ g
<i>R. eriocalyx</i>	Tablat <sup>(1)</sup>	221,4
<i>R. officinalis</i>	Tablat <sup>(2)</sup>	372,73
<i>R. officinalis</i>	Batna <sup>(3)</sup>	195,45

(1) : Echantillon étudié, (2): (Outaleb, 2009), (3): (Athamena, 2009).

L'extrait éthanolique du romarin étudié possède une teneur en composés phénoliques moyenne par rapport à celles d'autres échantillons du même genre indépendamment de la région géographique.

➤ **Extrait de *L. stoechas* :**

Le tableau 18 résume les résultats du dosage des phénols totaux des extraits de différentes espèces du genre *Lavandula*.

**Tableau 18:** Comparaison entre les teneurs en polyphénols des extraits de trois espèces de lavande.

Espèces	Provenance	Teneur en polyphénols mg eq AG/ g
<i>L. stoechas</i>	Tizi-ouzou <sup>(1)</sup>	132,3
<i>L. vera</i>	Bulgarie <sup>(2)</sup>	85,6
<i>L. dentata</i>	Maroc <sup>(3)</sup>	18,6

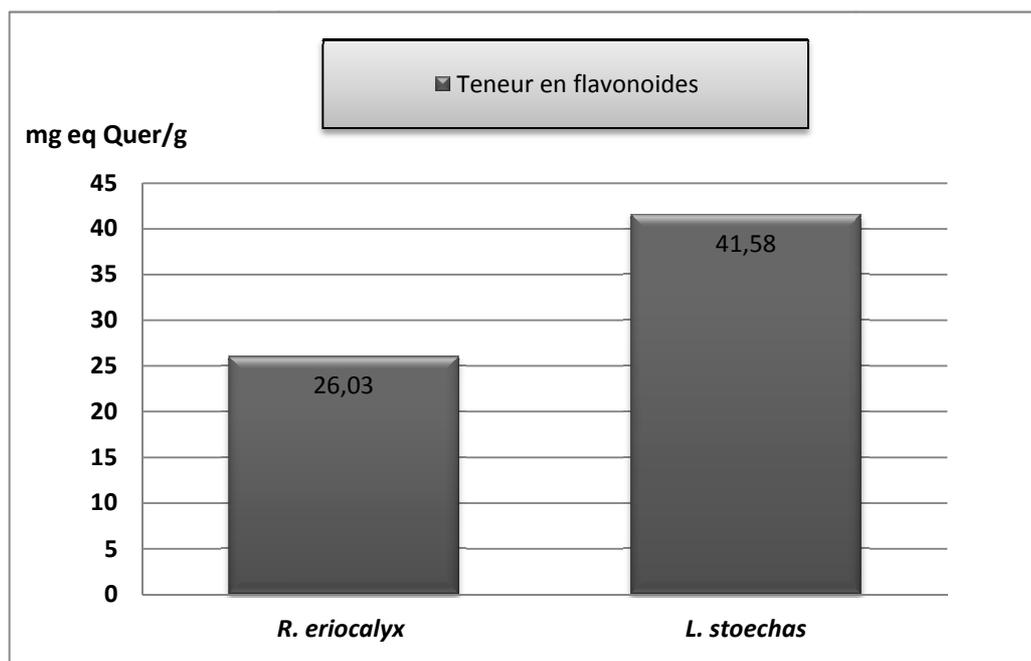
(1): Echantillon étudié; (2) : (Elena et al., 2008); (3): (Imelouane et al., 2009).

L'extrait de la lavande obtenu à partir de l'échantillon étudié a manifesté une forte teneur en composés phénoliques (**132,3 mg eq AG/ g d'extrait sec**), suivi par l'extrait de *L. vera* (**85,6 mg eq AG/ g d'extrait sec**) et l'extrait de *L. dentata* (**18,6 mg eq AG/ g d'extrait sec**).

### 7.2.Flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' $\text{AlCl}_3$  en utilisant la courbe d'étalonnage obtenue avec la quercétine.

La figure 54 rapporte les teneurs en flavonoïdes des extraits des deux plantes étudiées:



**Figure 54:** Teneurs en flavonoïdes des extraits de *R. eriocalyx* et *L. stoechas*

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes révèlent que l'extrait de la lavande est plus riche en flavonoïdes que celui du romarin, ceci malgré la forte teneur en phénols totaux de ce dernier (tableaux 19 et 20).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Bilusic et al., (2007)** qui ont montré une corrélation négative entre la teneur en polyphénols et celle des flavonoïdes de quelques espèces de *Stachys*.

➤ **Extrait de *R. eriocalyx* :**

Les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques de deux espèces de romarin sont représentées dans le tableau 19:

**Tableau 19:** Comparaison des teneurs en flavonoïdes de trois échantillons de romarin:

Espèces	Provenance	Teneur en flavonoïdes mg eq Quer/ g
<i>R. eriocalyx</i>	Tablat <sup>(1)</sup>	26,03
<i>R. officinalis</i>	Tablat <sup>(2)</sup>	38,14
<i>R. officinalis</i>	Constantine <sup>(3)</sup>	8,83

(1) : Echantillon étudié ; (2) : (Outaleb, 2009), (3) : (Zegquad, 2009).

Nous constatons que l'extrait de l'échantillon étudié **26,03 mg eq Quer/ g** semble posséder une teneur en flavonoïdes plus faible que celle de l'espèce *R. officinalis* provenant de la même région (**38,14 mg eq Quer/ g**) mais elle est plus élevée par rapport au romarin de Constantine (**8,83 mg eq Quer/ g**).

Les teneurs en flavonoïdes des différents échantillons de romarin sont variables au sein du même genre botanique et suivant la région de provenance.

➤ **Extrait de *L. stoechas* :**

Les résultats du dosage des flavonoïdes des extraits de deux échantillons de lavande sont illustrés dans le tableau 20:

**Tableau 20:** Teneurs en flavonoïdes de deux échantillons de lavande:

Espèces	Provenance	Teneur en flavonoïdes mg eq Quer/ g
<i>L. stoechas</i>	Tizi-Ouzou <sup>(1)</sup>	41,58
<i>L. dentata</i>	Maroc <sup>(2)</sup>	15,3

**(1) : Echantillon étudié; (2) : (Imelouane et al., 2009).**

L'extrait de *L. stoechas* étudiée possède une fraction importante de flavonoïdes par rapport à l'extrait issu de *L. dentata*, ceci pourrait, en principe conférer à l'extrait étudié une forte capacité antioxydante et insecticide.

### **8. Evaluation de l'activité antioxydante des HE et des extraits étudiés :**

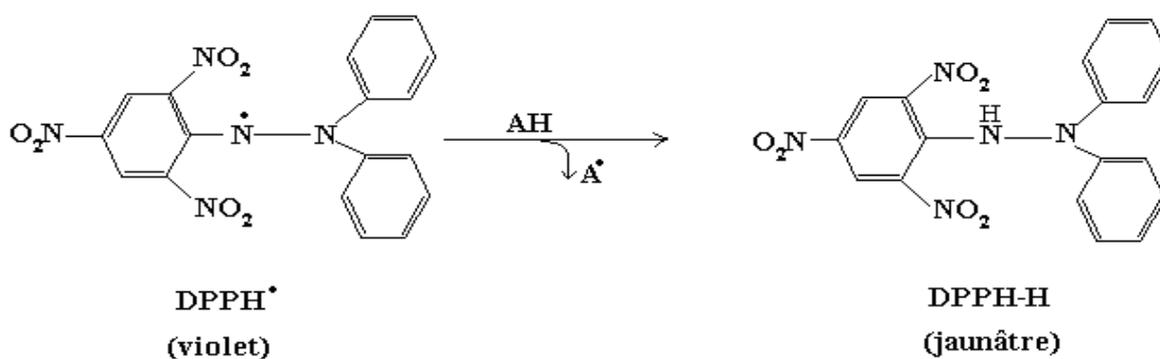
L'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits de *L. stoechas* et *R. eriocalyx* a été estimée en réalisant deux tests différents *In Vitro*, par la mesure de l'activité du piégeage du radical DPPH, et du pouvoir réducteur.

Le BHT (Butyl Hydroxy Toluène) qui est un antioxydant de synthèse, est pris comme témoin positif pour les deux tests.

### 8.1. Inhibition du radical DPPH :

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode au DPPH.

Le 2,2-DiPhényl-1-Picryl-Hydrazyle est un radical libre stable (DPPH<sup>•</sup>) possédant une coloration violette qui devient jaune pâle lorsqu'il est réduit (DPPH-H), la figure 55 illustre la réaction de réduction du DPPH:



**Figure 55:** Réaction de réduction du radical **DPPH** par un antioxydant **AH**

#### ➤ Cas des huiles essentielles :

Les résultats du test de piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles et par le BHT sont regroupés dans le tableau 21.

**Tableau 21:** Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par le BHT et par les huiles essentielles de romarin et de lavande.

Concentration en mg/l	Activité du piégeage du DPPH <sup>a</sup> en (%)		
	<i>R. eriocalyx</i>	<i>L. stoechas</i>	BHT
10	ND	ND	31,40±0,70
20	ND	ND	42,14±0,48
50	ND	ND	62,49±0,69
100	5,47±0,40	4,88±0,72	73,15±0,85
200	10,52±0,85	7,53±0,06	80,63±0,32
400	13,43±0,85	11,03±0,13	84,75±0,52
600	16,45±0,28	14,41±0,51	86,35±0,52
800	16,56±0,47	16,74±0,12	88,81±0,27
1000	24,11±0,34	19,69±1,29	91,07±0,13

**ND** : Valeur non déterminée.

<sup>a</sup>: Valeurs en moyenne ± écart-type.

Le pourcentage de piégeage du DPPH est en corrélation positive avec les concentrations utilisées pour tous les échantillons étudiés.

L'antioxydant de synthèse BHT possède l'activité de piégeage du radical DPPH la plus élevée qui a atteint une valeur de **91,07±0,13%** pour une concentration de **1000 mg/l**.

Par ailleurs, les résultats trouvés pour les huiles essentielles de romarin et de lavande confirment leurs faibles capacités à réduire le radical DPPH par rapport au BHT, ainsi leurs concentrations inhibitrices de 50% des radicaux n'ont pas été atteintes même à des doses élevées, alors que celle du BHT est déterminée à une concentration de **28,01 ±0,66 mg/l**.

En général, l'huile essentielle de *R. eriocalyx* a manifesté une activité de piégeage plus élevée que celle de *L. stoechas* et a atteint un pourcentage d'inhibition de **24,11±0,34%** pour la dose **1000 mg/l** tandis que l'huile de la lavande n'a enregistré que **19,69±1,29%** avec la même concentration.

L'huile essentielle de *R. eriocalyx* possède une activité antioxydante meilleure, que celle du *R. officinalis* de Tablat qui selon **Outaleb (2009)** a manifesté un pouvoir de piégeage de **17,09±0,35%** pour la dose **1000 mg/l**.

L'analyse de variance de l'effet de l'huile essentielle et des concentrations indique un effet hautement significatif ( $<0,01$ ) de ces deux facteurs sur l'activité du piégeage du radical DPPH (tableau 22).

**Tableau 22:** Récapitulatif de l'ANOVA de l'activité de piégeage du DPPH pour les deux huiles essentielles étudiées:

Source	Somme des carrées	ddl	Moyenne des carrées	F	Sig
<b>Huile</b>	60020,56	2,00	30010,28	101069,29	0,000
<b>Concentration</b>	1657,03	5,00	331,41	1116,12	0,000
<b>Interaction: Huile * Concentration</b>	51,60	10,00	5,16	17,38	0,000
<b>Erreur</b>	10,69	36,00	0,30		

➤ **Cas des extraits :**

Les résultats du test de piégeage du radical DPPH par deux extraits et par le BHT sont regroupés dans le tableau 23.

**Tableau 23:** Résultats du test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par le BHT et les extraits de romarin et de la lavande.

Concentration (mg/l)	Activité du piégeage du DPPH <sup>a</sup> (%)		
	<i>R. eriocalyx</i>	<i>L. stoechas</i>	BHT
2	10,18±0,83	9,36±0,72	ND
5	18,61±0,58	11,84±0,26	ND
10	50,90±0,26	24,46±0,87	31,40±0,70
20	70,69±0,49	45,91±0,82	42,14±0,48
50	91,18±0,36	87,69±0,75	62,49±0,69
100	92,18±0,56	89,21±0,49	73,15±0,85

ND: Valeur non déterminée.

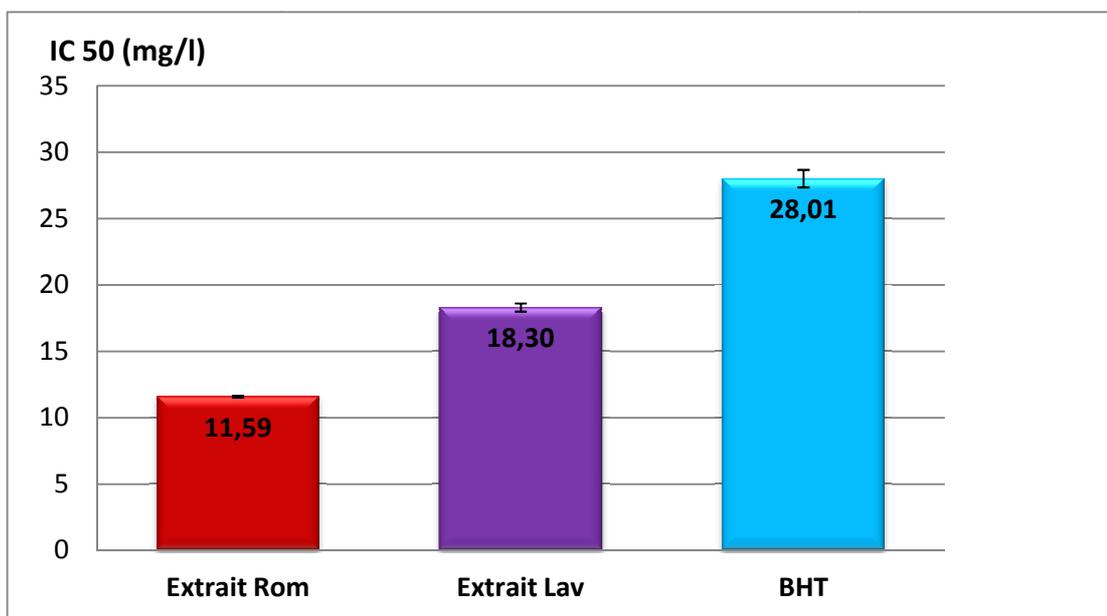
<sup>a</sup>: Valeurs en moyenne ± écart-type.

La même proportionnalité entre le pouvoir d'inhibition du radical DPPH et la dose pour le BHT et les huiles essentielles a pu être détectée pour les extraits étudiés.

Ainsi, les extraits éthanoliques du romarin et de la lavande ont montré une capacité élevée à réduire le DPPH par rapport à celle des huiles essentielles issues des mêmes plantes et ont dépassé le seuil de **90%** d'inhibition à **1000 mg/l**.

De même, l'activité anti-radicalaire du BHT s'est avérée relativement faible, comparée à celles des extraits. Cette activité est comparable pour les deux extraits malgré les valeurs légèrement supérieures enregistrées pour l'extrait du romarin.

La détermination des concentrations inhibitrices de 50% des radicaux a permis de classer les antioxydants utilisés selon leurs efficacités (Figure 56). La substance qui possède une valeur de  $IC_{50}$  plus faible a le pouvoir de piégeage le plus élevé.



**Figure 56:** Concentrations pour 50% d'inhibition des radicaux libres du BHT et des extraits de *R. eriocalyx* et *L. stoechas*.

L'extrait de romarin s'est avéré le plus efficace ( $IC_{50} = 11,59 \pm 0,07$  mg/l), suivi par celui de la lavande ( $IC_{50} = 18,30 \pm 0,31$  mg/l). Les extraits des deux plantes ont possèdent une capacité réductrice plus importante que celle du BHT ( $IC_{50} = 28,01 \pm 0,66$  mg/l).

Le fort pouvoir antioxydant des extraits étudiés est dû principalement à leurs teneurs élevées en composés phénoliques.

**Miguel (2010)** a reporté que les composés phénoliques peuvent manifester un fort pouvoir antioxydant *In Vitro*, ils piègent directement les espèces réactives à l'oxygène.

L'analyse de la variance de l'activité du piégeage du radical DPPH par les extraits de romarin et de la lavande montre que les deux facteurs (**Type de l'extrait utilisé et la concentration**) ainsi que le facteur (**Interaction: Extrait\*Concentration**) agissent de manière significative sur l'activité de piégeage du radical DPPH (tableau 24)

**Tableau 24:** Résultats de l'analyse de la variance de l'activité de piégeage du DPPH pour les deux extraits étudiés.

Source	Somme des carrées	ddl	Moyenne des carrées	F	Sig
<b>Extrait</b>	3306,295	2,00	1653,147	4070,121	0,000
<b>Concentration</b>	40363,590	5,00	8072,718	19875,383	0,000
<b>Interaction: Huile*Concentration</b>	1434,893	8,00	179,362	441,596	0,000
<b>Erreur</b>	12,997	32,00			

L'activité antioxydante des composés phénoliques est essentiellement déterminée par leurs structures, en particulier la délocalisation d'électrons sur leurs noyaux aromatiques.

Quand ces composés réagissent avec les radicaux libres, l'électron gagné de l'antioxydant phénolique se démobilise ce qui empêche la suite de la réaction en chaîne des radicaux libres.

### 8.2.Pouvoir réducteur :

Dans ce test l'évaluation de l'activité antioxydante consiste en une mesure de la capacité des huiles essentielles et des extraits, à réduire le fer ferrique  $Fe^{+3}$  en fer ferreux  $Fe^{+2}$ , donc la mesure de l'aptitude d'une huile essentielle ou d'un extrait à interagir avec des espèces chimiques réactives en tant que donneur d'électron tels que les radicaux libres. Ces radicaux ainsi réduits deviennent plus stables.

Pour ce test, le BHT a été pris comme témoin positif.

➤ **Cas des huiles essentielles :**

Le tableau 25 illustre les résultats des pouvoirs réducteurs des huiles essentielles de *R. eriocalyx* et de *L. stoechas* ainsi que celui du BHT.

**Tableau 25:** Pouvoir réducteur du BHT et des huiles essentielles de *R. eriocalyx* et *L. stoechas*.

Concentration (mg/l)	Absorbance <sup>a</sup> à 700 nm		
	<i>R. eriocalyx</i>	<i>L. stoechas</i>	BHT
100	0,026±0,004	0,031±0,004	0,863±0,011
200	0,093±0,013	0,106±0,019	1,063±0,024
400	0,326±0,014	0,166±0,005	1,161±0,008
600	0,355±0,002	0,204±0,005	1,178±0,005
800	0,426±0,024	0,292±0,002	1,218±0,036
1000	0,481±0,016	0,205±0,025	1,303±0,003

<sup>a</sup>: Valeurs en moyenne ± écart-type.

Les pouvoirs réducteurs des huiles essentielles et du BHT sont proportionnels aux concentrations utilisées.

L'huile essentielle *R. eriocalyx* possède une capacité réductrice plus importante que celle de *L. stoechas*.

Pour les deux huiles essentielles, ces capacités réductrices sont significativement faibles par rapport à celle du BHT. La quasi-absence des composés phénoliques dotés de forts pouvoirs réducteurs, dans le profil aromatique de ces huiles pourrait expliquer ces résultats.

Le tableau 26 illustre les résultats de l'analyse de la variance du pouvoir réducteur des huiles essentielles de romarin et de lavande:

**Tableau 26:** Analyse de la variance du pouvoir réducteur des huiles essentielles étudiées

Source	Somme des carrées	ddl	Moyenne des carrées	F	Sig
<b>Huile essentielle</b>	9,955	2,00	4,978	20642,675	0,000
<b>Concentration</b>	0,860	5,00	0,172	713,064	0,000
<b>Interaction: Huile * Concentration</b>	0,117	10,00	0,012	48,687	0,000
<b>Erreur</b>	0,009	36,00	0,000		

D'après les résultats obtenus, nous remarquons des effets significatifs de l'huile essentielle et de sa concentration sur le pouvoir réducteur. Cet effet est enregistré également pour le facteur (**Interaction: Huile essentielle\* Concentration**).

➤ **Cas des extraits :**

Le tableau 27 montre les résultats des pouvoirs réducteurs des extraits éthanoliques étudiées et du BHT.

**Tableau 27:** Pouvoir réducteur du BHT et des extraits de *R. eriocalyx* et *L. stoechas*.

Concentration (mg/l)	Absorbance <sup>a</sup> à 700 nm		
	<i>R. eriocalyx</i>	<i>L. stoechas</i>	BHT
<b>2</b>	0,012±0,001	0,014±0,005	ND
<b>5</b>	0,032±0,002	0,025±0,005	ND
<b>10</b>	0,078±0,002	0,056±0,006	ND
<b>20</b>	0,125±0,001	0,132±0,002	0,311±0,006
<b>50</b>	0,338±0,011	0,338±0,019	0,576±0,001
<b>100</b>	0,591±0,012	0,739±0,035	0,863±0,011

<sup>a</sup>: Valeurs en moyenne ± écart-type

Les résultats du tableau 27 montrent que les extraits sont nettement plus efficaces que les huiles essentielles obtenues à partir des mêmes plantes et agissent à de faibles doses (tableaux 25 et 27).

Le BHT reste l'antioxydant ayant le pouvoir réducteur supérieur à celui des deux extraits (tableau 27).

Les pouvoirs réducteurs des extraits de *L. stoechas* et *R. eriocalyx* sont comparables pour des concentrations comprises entre **2 et 50 mg/l**. Cependant pour la dose **100 mg/l**, une augmentation importante de la capacité réductrice de l'extrait de lavande est à noter.

En se référant aux teneurs des extraits en phénols totaux, ces résultats semblent être en contradiction avec la richesse en composés phénoliques de l'extrait du romarin par rapport à celui de la lavande.

Toutefois, le fort pouvoir réducteur de l'extrait de *L. stoechas* est attribuable à sa proportion en flavonoïdes **41,58 mg eq Quer /g d'extrait**, nettement supérieure à celle de *R. eriocalyx* **26,03 mg eq Quer /g d'extrait**.

Les tests statistiques prouvent que le pouvoir réducteur enregistré est fortement influencé par les trois facteurs (type d'extrait, concentration, et leur interaction) (tableau 28).

La variation de l'un de ces facteurs influencera très significativement l'activité réductrice enregistrée.

**Tableau 28:** Résultats de l'ANOVA du pouvoir réducteur pour les deux extraits étudiés:

Source	Somme des carrées	ddl	Moyenne des carrées	F	Sig
<b>Extrait</b>	0,259	2	0,130	933,131	0,000
<b>Concentration</b>	2,389	5	0,478	3437,884	0,000
<b>Interaction: Huile * Concentration</b>	0,33	7	0,005	33,942	0,000
<b>Erreur</b>	0,004	30	0,000		

## 9. Activité insecticide des huiles essentielles étudiées:

### 9.1. Toxicité des huiles essentielles par effet inhalation :

Nous avons enregistré la mortalité des adultes de *C. maculatus* dans les pots traités aux huiles essentielles ainsi que dans le pot témoin où aucun traitement n'a été appliqué.

Il est à noter qu'aucun changement de comportement n'a été observé chez les insectes du test témoin, ainsi la mortalité naturelle est nulle.

**Huile essentielle de lavande :**

L'exposition des adultes de *C. maculatus* à l'huile essentielle de *L. stoechas* à la dose **0,0291  $\mu\text{l}/\text{cm}^3$**  a induit la mort de la quasi-totalité des bruches au bout de 48 heures d'inhalation.

Quelques minutes après leur introduction à l'intérieur des pots traités, les insectes manifestent une modification de leur posture, ils ont un comportement agité, mais leur activité locomotrice apparaît normale.

L'effet toxique de l'huile essentielle augmente progressivement en fonction du temps d'exposition des insectes à l'effet d'inhalation de l'huile essentielle de lavande.

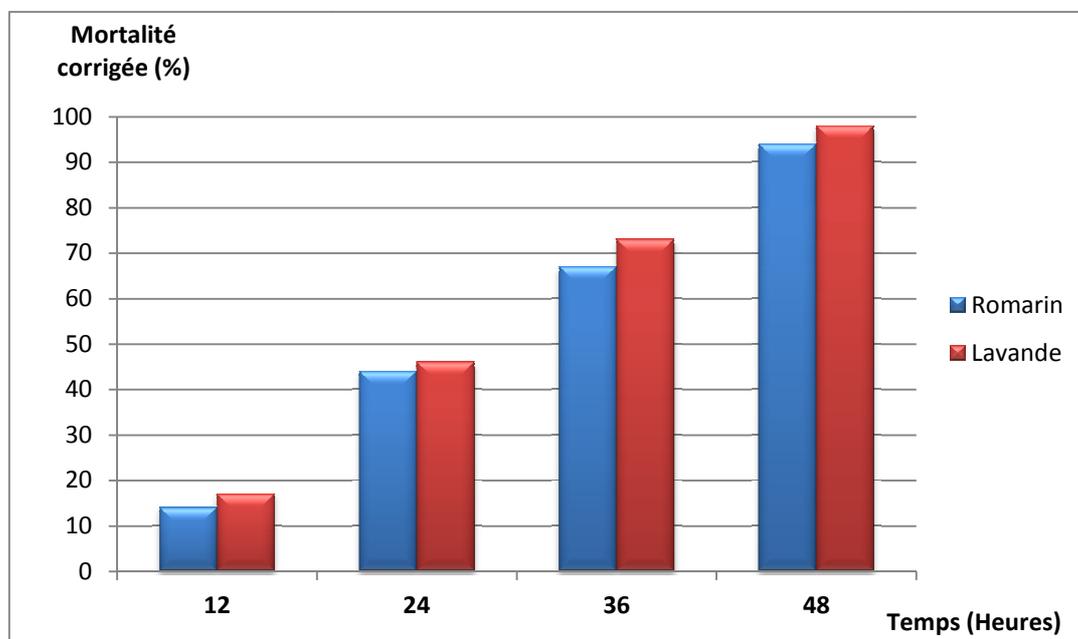
Après **12 heures**, nous enregistrons une mortalité de **17%** et atteint **46%** à la fin du **premier jour** de traitement. Puis elle augmente régulièrement vers **73%** après **36 heures** et **98 %** à la fin du traitement (au bout de 48 heures).

**Huile essentielle de romarin :**

Nous remarquons une diminution de l'effectif vivant des adultes de *C. maculatus* après inhalation de l'huile essentielle de *R. eriocalyx* à une dose de **0,0291  $\mu\text{l}/\text{cm}^3$** , cette action efficace de l'huile essentielle de Romarin augmente remarquablement avec la progression du temps.

Ainsi, nous avons pu enregistrer une mortalité de **14%** après **12 heures** d'exposition, puis **44%** après **24 heures**. Ce taux de mortalité a atteint les **64%** dans **36 heures** pour arriver à **94%** à la fin du traitement.

La figure 57 résume les mortalités corrigées des adultes de *C. maculatus* par inhalation des deux huiles essentielles étudiées:

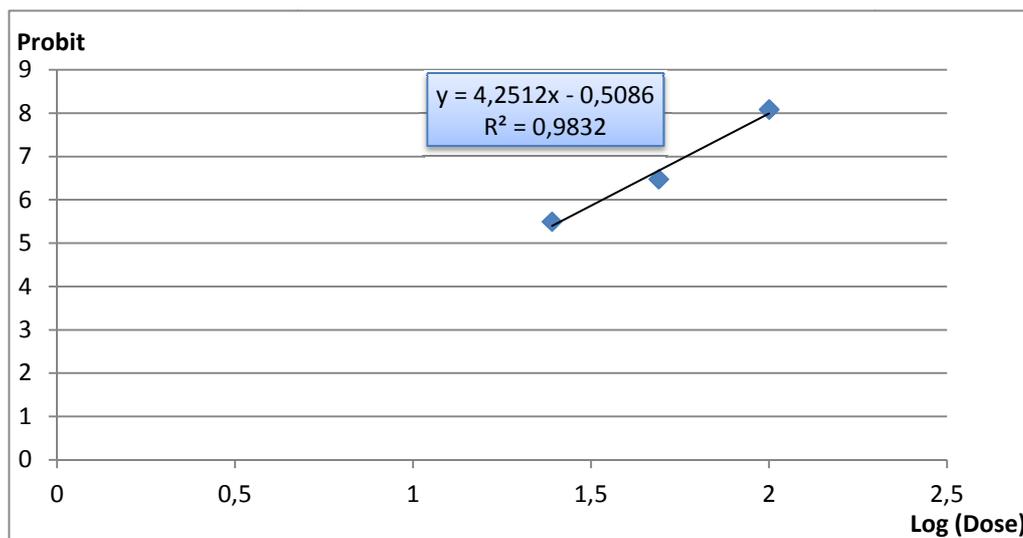


**Figure 57:** Mortalité corrigée des adultes de *C. maculatus* par inhalation des d'huiles essentielles en fonction du temps

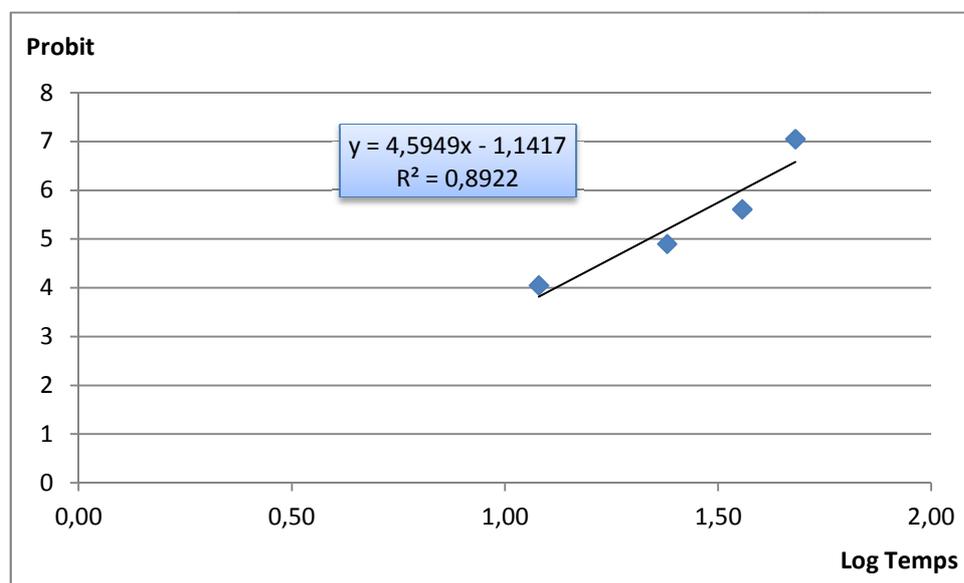
Nous constatons que les huiles essentielles extraites à partir des plantes étudiées possèdent une activité biocide à l'égard des adultes de *C. maculatus*, l'effet de l'huile de romarin est moins fort que celui de l'huile essentielle de lavande, toutefois l'évolution de la mortalité des insectes progressivement en fonction du temps reste identique pour les deux huiles.

#### **Détermination des $TL_{50}$ et $TL_{90}$ des huiles essentielles:**

Les courbes de régression des mortalités exprimées en Probit en fonction du Logarithme décimal du temps permettent le calcul des temps létaux à 50% et à 90% (Figures 58 et 59).

**Cas du romarin:**

**Figure 58:** Détermination des TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> de l'huile essentielle de *R. eriocalyx* par effet inhalation vis-à-vis de *C. maculatus*.

**Cas de la lavande :**

**Figure 59:** Détermination des TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> de l'huile essentielle de *L. stoechas* par effet inhalation vis-à-vis de *C. maculatus*.

Le tableau 29 rapporte les valeurs des temps létaux à 50% et à 90% des huiles essentielles étudiées :

**Tableau 29:** TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> des huiles essentielles de romarin et de lavande.

Temps létaux	Huiles essentielles	
	<i>R. eriocalyx</i>	<i>L. stoechas</i>
TL <sub>50</sub> (heures)	26,30	21,71
TL <sub>90</sub> (heures)	46,27	41,24

Le tableau 29 montre que les deux huiles essentielles étudiées sont dotées d'une activité insecticide par effet inhalation.

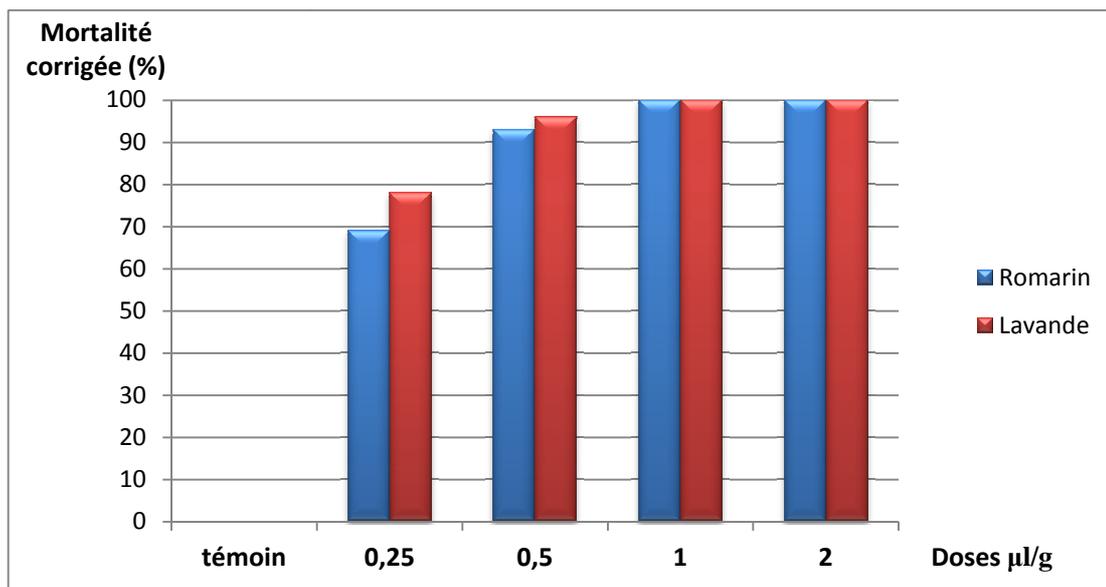
D'après ces résultats, nous constatons que l'huile essentielle de *L. stoechas* est plus efficace sur les bruches de niébé avec des valeurs de TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> plus faibles que celles enregistrées pour l'huile de *R. eriocalyx*, ce qui permet d'atteindre la mortalité de 50% puis de 90% des adultes plus rapidement.

## 9.2. Toxicité des huiles essentielles par effet contact :

La mortalité des adultes de *C. maculatus* dans les bocaux contenant les graines de pois chiche traitées aux huiles essentielles a été enregistrée pour les différentes doses ainsi que pour le test témoin où aucun traitement n'a été appliqué.

De même pour le test de l'effet inhalation, la mortalité naturelle des insectes était nulle.

La figure 60 résume les résultats du test contact des deux huiles essentielles étudiées:



**Figure 60:** Mortalité corrigée des adultes de *C. maculatus* par effet contact en fonction des doses d'huiles essentielles.

➤ **Huile essentielle de romarin:**

Il y avait une augmentation progressive de la mortalité de *C. maculatus* avec l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle de *R. eriocalyx*.

La plus faible dose utilisée (**0,25  $\mu\text{l/g}$** ) a manifesté une forte activité insecticide et a provoqué la mort de 69% des adultes.

Les doses les plus fortes ont permis d'augmenter le pourcentage de mortalité pour atteindre les 100% à une concentration de **1  $\mu\text{l/g}$** .

➤ **Huile essentielle de lavande:**

Les résultats obtenus montrent que la mortalité des adultes élevée sur des graines de pois chiches traitées à l'huile essentielle de *L. stoechas* augmente proportionnellement avec la concentration utilisée.

Ainsi, le seuil de 50% de mortalité a été largement dépassé avec la dose de **0,25  $\mu\text{l/g}$**  et a atteint un pourcentage 78%.

Par la suite, le taux de mortalité augmente rapidement vers 96% puis 100% à la dose **1 µl/g**.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les huiles essentielles extraites de *R. eriocalyx* et *L. stoechas* possèdent un effet toxique contre les adultes de *C. maculatus*; cet effet insecticide est proportionnel aux concentrations utilisées.

Pour les deux huiles essentielles, une dose de **0,25 µl/g** est suffisante pour atteindre la mortalité de 50% d'individus.

Il est à noter que la mort de tous les insectes est provoquée par l'utilisation d'une dose de **1 µl/g**, et ceci pour les deux huiles.

Aux doses les plus faibles (**0,25 et 0,5 µl/g**), l'huile essentielle de lavande a manifesté un pouvoir insecticide élevé par rapport à celui enregistré pour l'huile du romarin.

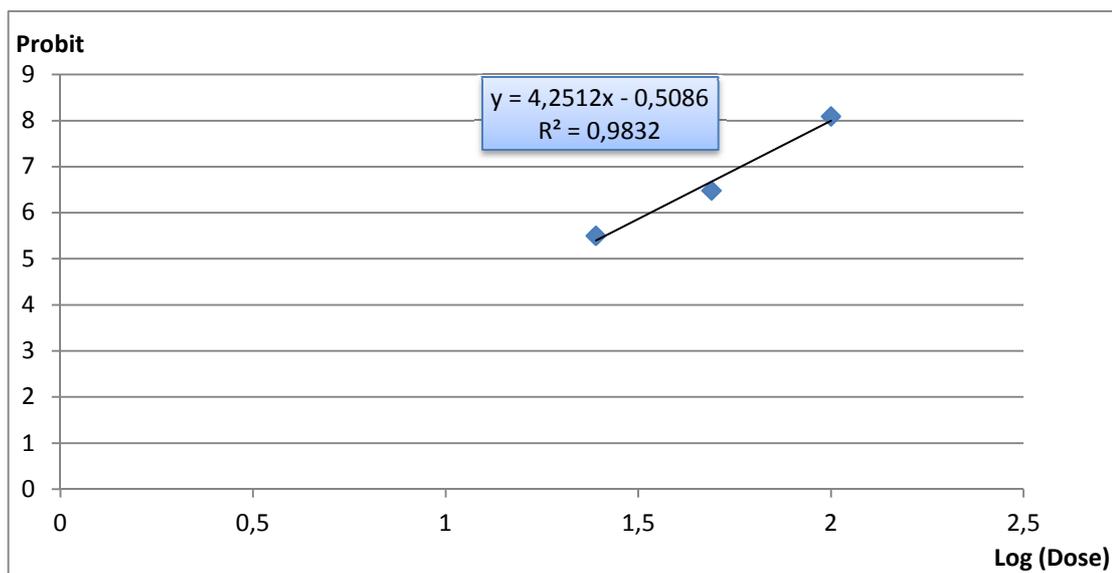
**Gakuru et Foua-Bi (1995)**, rapportent que les huiles essentielles d'*Eucalyptus cotrodora* et *Ocinum basilicum* sont très efficaces contre les adultes de *Callosobruchus maculatus*.

**Ilboudo et al., (2010)** ont affirmé que la forte l'activité insecticide des huiles essentielles de *O. americanum* enregistrée contre la bruche du niébé *C. maculatus*, n'a pas persisté pour une longue durée et n'a pas excédé 18 jours.

- **Détermination des DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> des huiles essentielles:**

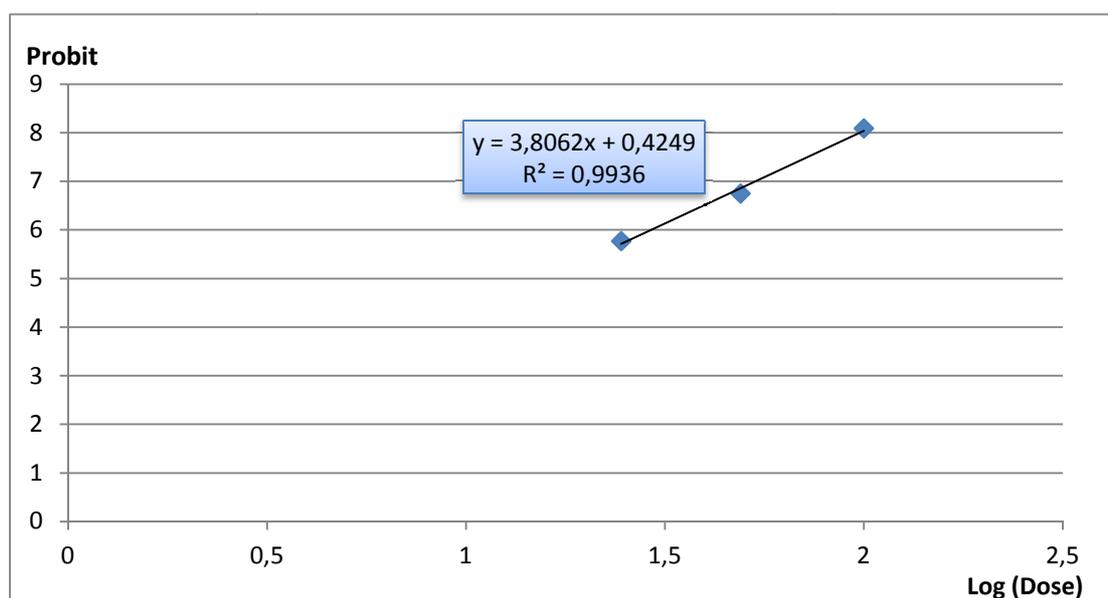
Les courbes de régression des mortalités exprimées en Probit en fonction du Logarithme décimal des doses permettent le calcul des doses létales à 50% et à 90% (Figures 61 et 62).

## ➤ Cas du romarin :



**Figure 61:** Détermination des  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$  de l'huile essentielle de *R. eriocalyx* par contact.

## ➤ Cas de la lavande:



**Figure 62:** Détermination des  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$  de l'huile essentielle de *L. stoechas* par contact.

Le tableau 30 rapporte les valeurs des doses létales à 50 et 90% des huiles essentielles.

**Tableau 30:** DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> des huiles essentielles de romarin et de lavande.

Doses létales	Huiles essentielles	
	<i>R. eriocalyx</i>	<i>L. stoechas</i>
DL <sub>50</sub> µl/g	0,19	0,16
DL <sub>90</sub> µl/g	0,39	0,34

Ce tableau indique des doses létales à 50% et 90% qui sont faibles pour les deux huiles essentielles mais avec des valeurs plus élevées dans le cas de l'huile de romarin.

Les résultats obtenus montrent que les deux huiles essentielles possèdent une activité insecticide vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus*, et que l'huile essentielle de lavande est la plus efficace car elle agit à des concentrations plus faibles.

Les résultats de l'analyse de la variance de la mortalité des insectes en fonction de l'huile essentielle utilisée et de sa dose sont regroupés dans le tableau 31:

**Tableau 31:** Analyse de la variance de la mortalité des adultes de *C. maculatus* par effet contact :

Source	Somme des carrées	ddl	Moyenne des carrées	F	Sig
Huile	144,00	1	144,00	1,878	0,174
Concentration	144954,00	4	36238,50	472,676	0,000
<b>Interaction:</b>					
Huile *	306,00	4	76,50	0,998	0,413
Concentration					
Erreur	6900,00	90	76,66		

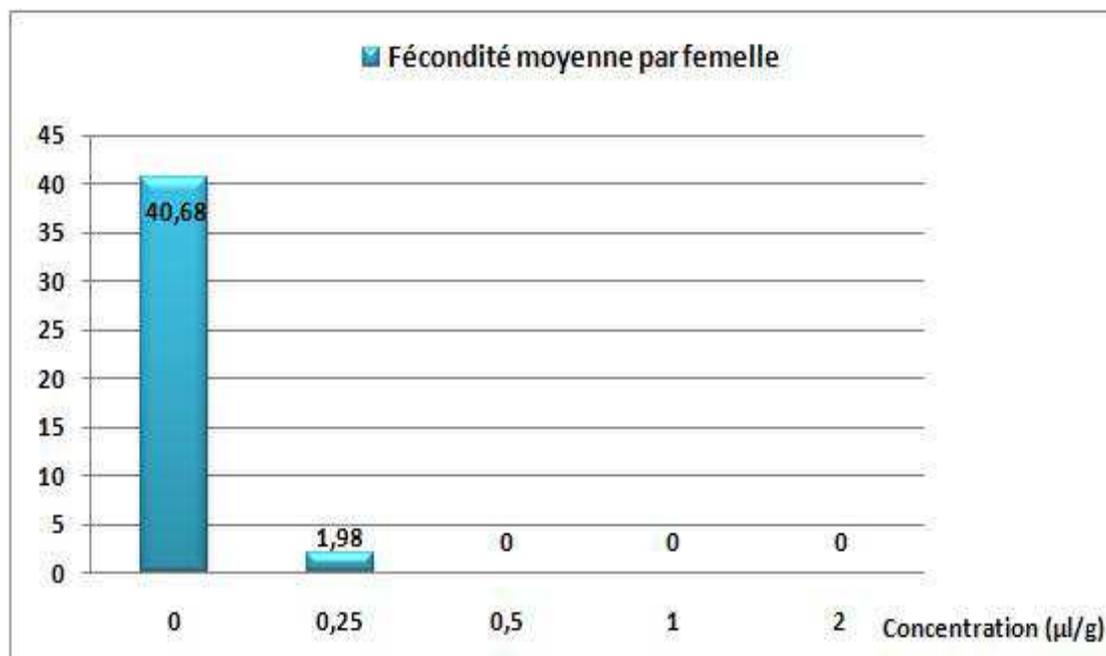
Le tableau 33 montre un effet hautement significatif de la concentration sur le taux de mortalité des adultes. Par ailleurs, les deux autres facteurs (**Type d'huile et Interaction: Huile\*Concentration**) n'influencent pas sur cette mortalité.

Les résultats obtenus révèlent un effet insecticide comparable pour les huiles essentielles du romarin et de la lavande.

### 9.3. Evaluation de l'effet des huiles essentielles sur la fécondité:

#### ➤ Huile essentielle de romarin:

Les fécondités moyennes des femelles de *Callosobruchus maculatus* en fonction de la concentration de l'huile essentielle de romarin sont regroupées dans la figure 63:

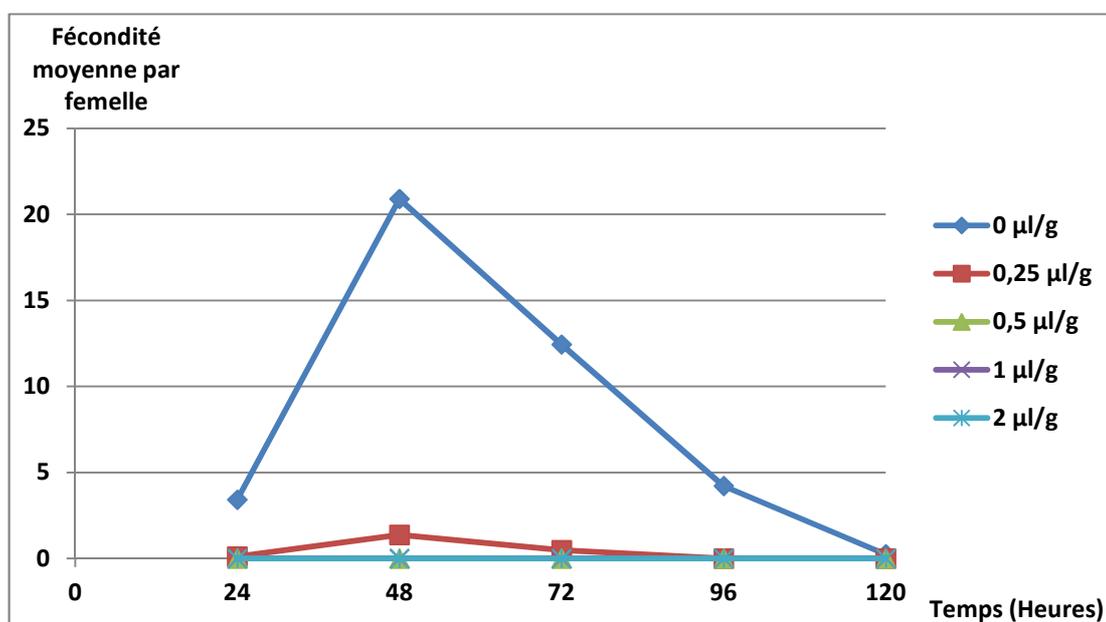


**Figure 63:** Nombre d'œufs pondus par femelle de *C. maculatus* traitée à l'huile essentielle de *R. eriocalyx* en fonction de la concentration

L'utilisation de l'huile essentielle dans le traitement des graines de pois chiche a provoqué une très forte diminution de la fécondité des femelles, ainsi le nombre d'œufs pondus par femelle est passé de 40,68 pour le test témoin à 1,98 avec la dose **0,25 µl/g**.

Les concentrations les plus fortes (**0,5 ; 1 et 2 µl/g**) ont provoqué l'arrêt total de la ponte.

La variation de la fécondité moyenne par femelle de *C. maculatus* traitée avec l'huile essentielle de romarin en fonction du temps est représentée par la figure 64:



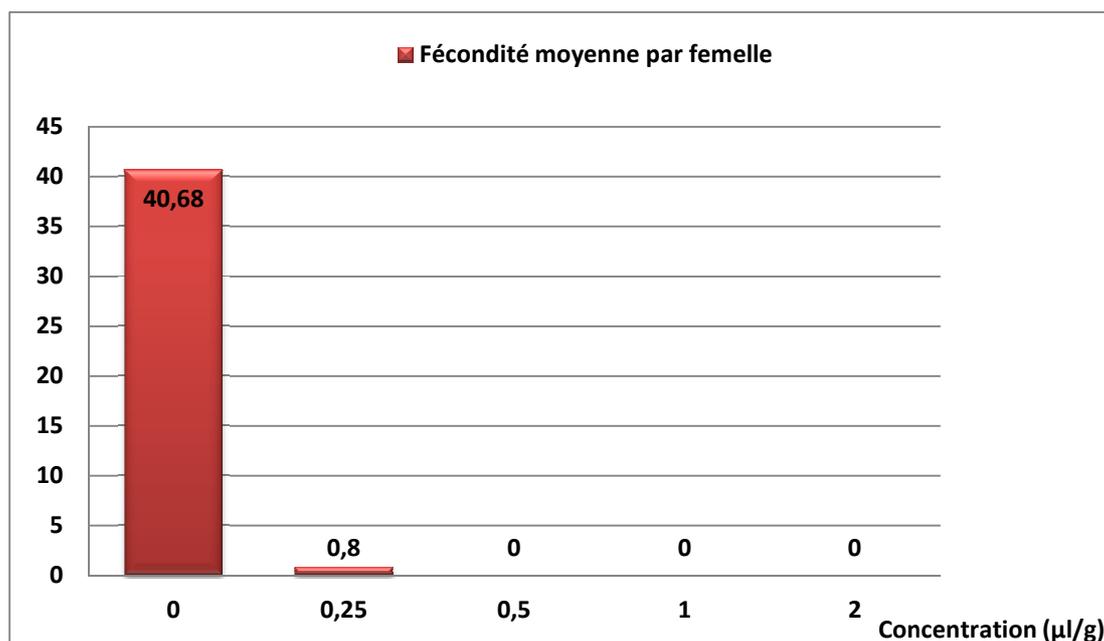
**Figure 64:** Evolution du nombre d'œufs pondus moyen par femelle de *C. maculatus* traitée à l'huile essentielle de romarin en fonction du temps.

Nous remarquons que quelque soit la dose de l'huile essentielles de romarin utilisée, la ponte commence après 24 heures, elle augmente rapidement pour atteindre son maximum au deuxième jour.

A partir du troisième jour, nous observons une diminution rapide du nombre d'œufs pondus qui tend vers zéro au bout du cinquième jour de l'expérimentation.

➤ **Huile essentielle de lavande:**

La figure 65 rapporte le nombre d'œufs pondus par femelle de *C. maculatus* ayant subi le traitement avec l'huile essentielle de lavande.



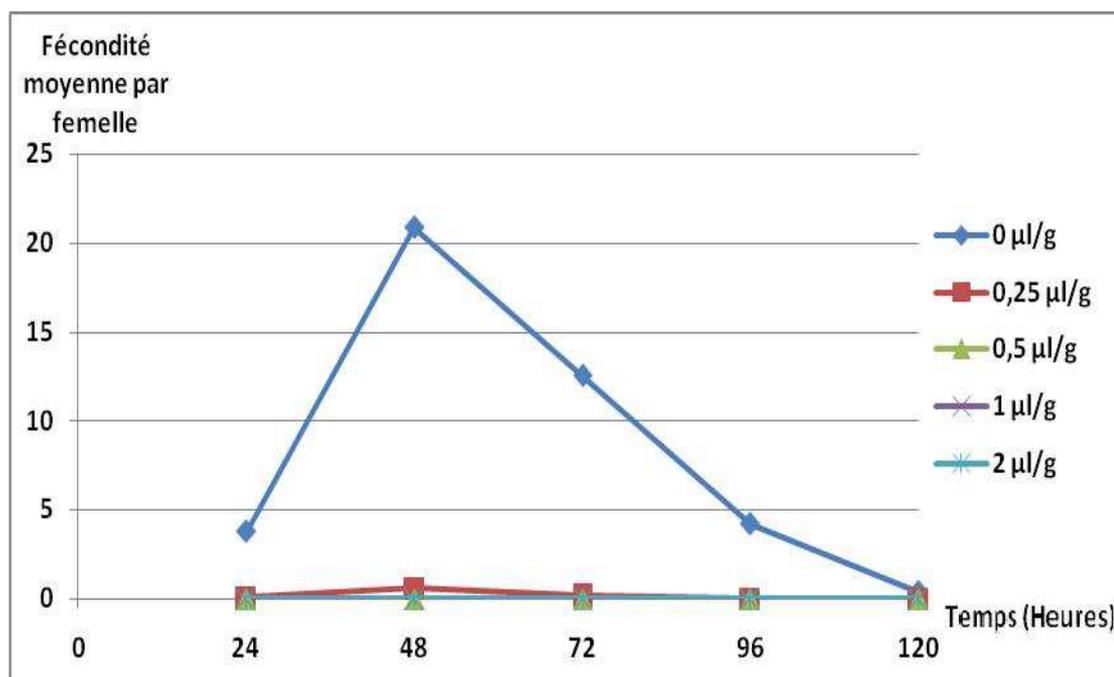
**Figure 65:** Nombre d'œufs pondus par femelle de *C. maculatus* traitée à l'huile essentielle de *L. stoechas* en fonction de la concentration

Suite au traitement des lots d'insectes par l'huile essentielle de lavande, la fécondité des femelles a remarquablement diminué par rapport au test témoin, ainsi l'utilisation d'une dose de **0,25 µl/g** a permis de réduire le nombre d'œufs pondus par femelle à 0,8.

Avec des concentrations plus élevées, aucune ponte n'a été observée.

Le nombre d'œufs pondus par femelles a baissé de 40,68 à 1,96 en utilisant l'huile de romarin à **0,25  $\mu\text{l/g}$** , tandis que l'utilisation de l'huile essentielle de lavande à la même dose n'a laissé que 0,8 œufs par femelle.

La figure 66 illustre l'évolution du nombre moyen d'œufs pondus par femelle de *C. maculatus* traitée à l'huile essentielle de *L. stoechas* en fonction du temps.



**Figure 66:** Evolution du nombre d'œufs pondus moyen par femelle de *C. maculatus* traitée à l'huile essentielle de lavande en fonction du temps.

Nous constatons que la variation de la fécondité moyenne des femelles traitées avec l'huile essentielle de lavande a la même allure que celle observée en utilisant l'huile de romarin.

Ainsi, les premiers œufs sont pondus au cours du premier jour, leur nombre augmente et arrive la valeur maximum en 48 heures. La fécondité diminue progressivement après le troisième jour et s'approche du zéro à la fin du cinquième jour.

Nous notons aussi que les deux traitements ont provoqué l'arrêt de ponte à partir de la même concentration (**0,5 µl/g**).

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Rajapakse (1996)** qui a signalé que ponte des femelles de *C. maculatus* peut être complètement inhibée par les huiles volatiles de *Piper nigrum*.

Selon **Kellouch et Soltani (2003)**, la réduction de la fécondité des femelles de *Callsobruchus maculatus* traitées par l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* n'est pas seulement liée à la diminution de la période de ponte ou de la survie des femelles mais elle est également le résultat du processus de vitellogénèse.

En utilisant l'huile essentielle de *Ocimum basilicum* à **0,5 µl/cm<sup>2</sup>**, on a obtenu une mortalité de 98% des adultes de *C. maculatus* ainsi qu'une réduction de la fécondité de 77% par rapport test témoin (**Pascual-Villalobos et Ballesta-Acosta; 2002**).

Les huiles essentielles de *L. stoechas* et de *R. eriocalyx* peuvent être signalées comme des forts inhibiteurs de la ponte des femelles de *C. maculatus*, leur efficacité peut être une probable utilisation en plein champs ou sur des entrepôts et des stocks de graines de légumineuses.

Cette utilisation pourrait permettre un contrôle plus efficace de population des bruches, notamment celle de *C. maculatus*.

**Tableau 34:** Résultats de l'analyse de la variance de la fécondité des femelles de *C. maculatus*.

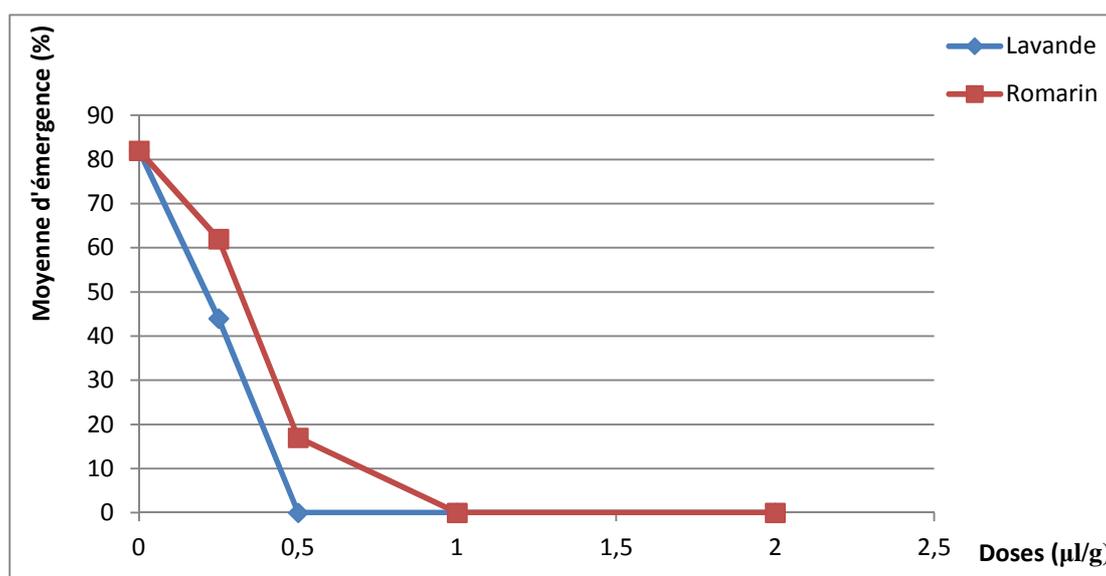
Source	Somme des carrées	ddl	Moyenne des carrées	F	Sig
<b>Huile</b>	1,392	1	1,392	1,142	0,288
<b>Concentration</b>	26056,350	4	6514,088	5341,946	0,000
<b>Interaction: Huile * Concentration</b>	5,570	4	1,392	1,142	0,342
<b>Erreur</b>	109,748	90	1,219		

Nous remarquons que le nombre d'œufs pondus est fortement lié à la concentration en huile essentielle utilisée d'une part et d'une autre part, la variation du type d'huile essentielle n'influence pas sur la fécondité des femelles vu son effet non significatif enregistré.

D'une autre part, on n'a enregistré aucun effet significatif des facteurs (**Huile essentielle et l'interaction Huile\*Concentration**) sur la fécondité des femelles de *C. maculatus*.

#### 9.4.Effet des huiles essentielles sur la fertilité:

La figure 67 donne la variation du pourcentage moyen d'éclosion des œufs de *C. maculatus* en fonctions des doses utilisées pour les deux huiles essentielles étudiées.



**Figure 67:** Variation du pourcentage moyen d'éclosion de *C. maculatus* en fonction des doses des huiles essentielles de romarin et de lavande.

En général, on remarque que le taux d'œufs éclos diminue avec l'augmentation des doses utilisées pour les deux huiles essentielles.

Pour le test témoin, le pourcentage d'éclosion du ravageur est de **82%**.

Pour l'huile essentielle de romarin, les doses **0,25 µl/g et 0.5 µl/g** ont permis de diminuer le taux d'émergence à **62%** et **17%** respectivement.

En utilisant les concentrations les plus élevées (**1 et 2 µl/g**), l'éclosion des œufs était nulle.

En ce qui concerne l'huile essentielle de lavande, le pourcentage moyen d'éclosion a diminué de **82%** à **44%** avec la dose **0,25 µl/g**.

Les concentrations plus élevées (**0,5 ; 1 et 2 µl/g**) ont permis de réduire ce pourcentage à zéro.

L'huile essentielle de lavande possède un effet sur la fertilité plus important que celui enregistré avec l'huile essentielle de romarin.

Nos résultats mettent en évidence, l'effet des deux huiles essentielles sur la fertilité des œufs de *C. maculatus*.

Le nombre d'œufs éclos diminue progressivement en fonction des doses d'huiles essentielles utilisées.

L'utilisation de nos huiles essentielles permet de réduire le nombre d'œufs pondus (fécondité) ainsi que le pourcentage d'œufs éclos (fertilité), ce qui permet de diminuer le niveau d'infestation du ravageur au sein des stocks.

Ces résultats viennent confirmer ceux de **Gbolade et al., (1999)**, qui ont obtenu une mortalité de 95-97% par fumigation d'huile essentielle d'*Agertum conyzoides* sur les adultes de *C. maculatus*.

D'une autre part, les auteurs ont constaté une réduction significative de la ponte ainsi qu'une inhibition complète de l'émergence.

D'après les résultats de l'analyse de la variance de la fertilité des œufs regroupés dans le tableau 35, les facteurs (**Type d'huile essentielle et Concentration**) agissent significativement sur la fertilité des œufs, nous signalons également l'effet significatif du facteur (**Interaction: Huile essentielle\*Concentration**) sur le nombre d'œufs éclos.

**Tableau 35:** Récapitulatif de l'analyse de la variance de la fertilité des œufs de *C. maculatus* exprimée par les deux huiles essentielles :

Source	Somme des carrées	ddl	Moyenne des carrées	F	Sig
<b>Huile essentielle</b>	1225,00	1	1225,00	22,363	0,000
<b>Concentration</b>	109736,00	4	27434,00	500,824	0,000
<b>Interaction: Huile * Concentration</b>	1840,00	4	460,00	8,398	0,000
<b>Erreur</b>	4930,00	90	54,778		

## *Conclusion générale*

## Conclusion générale :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne. Il a porté sur deux plantes aromatiques de la famille des lamiacées : le romarin : *Rosmarinus eriocalyx* et la lavande (*Lavandula stoechas*).

Nous nous sommes intéressés à l'extraction, à la caractérisation et l'évaluation des activités biologiques (antioxydante et insecticide) des extraits végétaux de ces plantes.

L'objectif de cette étude est une potentielle utilisation des huiles essentielles et des extraits éthanoliques de ces dernières, dans la prévention des altérations des produits alimentaires, et ceci en remplaçant les agents chimiques couramment employés et qui peuvent avoir des conséquences néfastes sur la santé de l'homme de même que sur son environnement.

Les principaux résultats obtenus sont:

### 1- L'extraction et caractérisation des huiles essentielles et des extraits éthanoliques :

➤ L'observation des coupes anatomiques des feuilles et des fleurs de *R. eriocalyx* et de *L. stoechas* a révélé la présence poils tecteurs, sécréteurs et glandulaires qui constituent les structures responsables de la synthèse et du stockage de l'huile essentielle.

Cette organisation anatomique est caractéristique de la famille des lamiacées à laquelle appartiennent les deux plantes étudiées.

➤ L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation a fourni des rendements de **0,16** et **1,6 ml/ 100 g de matière végétale fraîche** pour *L. stoechas* et *R. eriocalyx* respectivement.

➤ La cinétique d'extraction de l'huile essentielle de *R. eriocalyx* a montré que le temps optimal est de **35 min**, ce qui permet d'obtenir le rendement maximal de **1,6 ml /100 g de matière végétale fraîche**.

➤ L'analyse de l'huile essentielle de *L. stoechas* par CPG et CPG/SM a révélé la présence de 31 composés dont 5 sont majoritaires: fenchone (**11%**), camphor (**6,85%**), bornyl acétate (**6,3%**), sabinyl acétate (**6,2%**) et le 1,8-cineol (**4,9%**).

Cette composition chimique correspond à une huile essentielle de chémotype **fenchone/camphor**.

➤ L'analyse de l'huile essentielle *R. eriocalyx*, nous a permis d'identifier 41 composés dont le camphor est majoritaire avec une teneur de **39,4%**, suivi du p-cymène + limonène (**11%**), de l' $\alpha$ -pinène (**10,4%**) et du camphène (**9,6%**).

➤ La caractérisation des deux huiles essentielles a montré une domination de la fraction oxygénée par rapport aux autres groupes chimiques avec un pourcentage de **45,9** et **52,9%** pour *L. stoechas* et *R. eriocalyx* respectivement.

➤ Les extraits éthanoliques ont enregistré des rendements de **19,29** et **30,59%** pour *L. stoechas* et *R. eriocalyx* respectivement.

➤ Le dosage des phénols totaux a révélé une teneur de **132,2 mg éq d'acide gallique/g** d'extrait pour *L. stoechas* et **221,4 mg éq d'acide gallique/g** d'extrait pour *R. eriocalyx*.

➤ Les teneurs en flavonoïdes sont en général appréciables (**41,58 mg éq de quercétine/ g d'extrait**) pour *L. stoechas* et (**26,03 mg éq de quercétine/g d'extrait**) pour *R. eriocalyx*.

## 2- Activité antioxydante:

L'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits étudiés a été évaluée par deux tests *In Vitro* différents: l'inhibition du radical DPPH et le pouvoir réducteur.

➤ Les résultats du test de piégeage du radical DPPH révèlent une faible capacité inhibitrice des huiles essentielles étudiées par rapport à celle du BHT.

➤ Pour toutes les concentrations utilisées, l'huile essentielle de *R. eriocalyx* a manifesté une activité antiradicalaire plus forte que celle enregistrée pour l'huile essentielle de *L. stoechas*.

- Pour la concentration (**1000 mg/l**), nous avons pu atteindre un pourcentage d'inhibition du DPPH de **24,11±0,34%** pour l'huile essentielle de *R. eriocalyx* et de **19,69±1,29%** avec l'huile essentielle de *L. stoechas*. Par conséquent, les concentrations inhibitrices de 50% des radicaux (**IC<sub>50</sub>**) n'ont pas pu être déterminées.
- Les extraits éthanoliques du romarin (**IC<sub>50</sub>= 11,59±0,07 mg/l**) et de la lavande (**IC<sub>50</sub>= 18,30±0,31 mg/l**) ont montré une activité de piégeage du DPPH plus élevée que celle du BHT (**IC<sub>50</sub>= 28,01±0,66 mg/l**).
- Les huiles essentielles de *L. stoechas* et de *R. eriocalyx* ont montré un faible pouvoir réducteur par rapport au BHT, de même les extraits n'ont pas manifesté de fort pouvoir antioxydants malgré leurs fortes teneurs en polyphénols et en flavonoïdes.

### 3- Activité insecticide:

L'efficacité des huiles essentielles en tant qu'insecticides utilisables en pratique a été étudiée contre un ravageur (*Callosobruchus maculatus*) qui se développe et contamine les stocks de graines de pois chiches.

- L'évaluation de la toxicité des huiles essentielles sur les adultes âgés de 24 heures a montré une forte activité insecticide par effet inhalation. La lavande est la plus toxique avec des temps létaux à **50%** et à **90%** de la population d'insectes de **21,71** et **41,24 heures** respectivement, tandis que pour le romarin ces temps sont de **26,30** et **46,27 heures** pour une dose de **0,0291 µl/cm<sup>3</sup>**.
- L'évaluation de l'effet insecticide par contact, a montré que les deux huiles essentielles sont très efficaces contre *C. maculatus*. Les doses létales à **50%** et à **90%** de la population d'insectes ont été déterminées. Ces dernières sont de **0,16** et **0,34 µl/g** pour *L. stoechas* et de **0,19** et **0,39 µl/g** pour *R. eriocalyx*.
- L'étude de l'effet des huiles essentielles de *L. stoechas* et *R. eriocalyx* sur la fécondité des femelles a révélé une réduction significative cette dernière, ainsi leur

utilisation à une dose **0,25 µl/g** a permis de réduire le nombre d'œufs pondus par femelle de **40,68** à **0,8** avec la lavande et à **1,96** avec le romarin. Des concentrations plus élevées ont entraîné un arrêt total de la ponte.

➤ La fertilité des œufs traités avec les huiles essentielles a diminué très significativement, et ceci en fonction de la dose utilisée. Ainsi, à titre d'exemple, pour un traitement des graines de pois chiches avec des concentrations supérieures à **1 µl/g**, le taux d'émergence est nul.

- Les huiles essentielles de *R. eriocalyx* et *L. stoechas* ont présenté de forts pouvoirs insecticides contre *Callosobruchus maculatus*, un coléoptère causant des dégâts importants sur les denrées alimentaires stockées.

- Ces extraits ont provoqué la mortalité de cet insecte, une réduction significative de la fécondité des femelles et de la fertilité des œufs pondus. Tous ces effets sont valorisables dans le contrôle des populations de ravageurs des stocks de légumineuses.

Ce travail peut être le point d'appui pour une étude plus détaillée des extraits de *R. eriocalyx* et *L. stoechas* où il serait intéressant:

- D'analyser des huiles essentielles des plantes issues de plusieurs régions d'Algérie et sur plusieurs saisons.

- D'adopter des techniques d'analyse plus poussées des huiles essentielles pour une meilleure compréhension de la composition chimique de ces dernières.

- D'approfondir la caractérisation des extraits éthanoliques et identifier les composés responsables de leur forte activité antioxydante.

- Evaluer l'activité antimicrobienne et cicatrisante des huiles essentielles et extraits éthanoliques.

## *Références bibliographiques*

**Références bibliographiques:**

**Abdel-Sattar E., Zaitoun A.A., Farag M. A., El Gayed S. H., Harraz F. M., 2009.** Analyst, vol.127, p.183.

**AFNOR, 2000.** Normes françaises : huile essentielle. Paris, Association Française de Normalisation.

**Anders B., 2002.** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. University of Toronto, Canada, vol.13, n.2, p.184-196.

**Anizon J.Y., Lemaire B., Surbled M., 2002.** Extraction assistée par micro-ondes. Techniques de l'Ingénieur, Traité Agroalimentaire, F 3060, 10p.

**Arnold, N.; Valentini, G.; Bellomaria, B. 1997.** Journal of essential oil Research. vol.9, p.167-175.

**Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Edition. Masson, Paris.

**Aruoma O. I., Spencer J. P., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., MunozA., Murcia A., Butler J., Halliwell B. 1996.** An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of Rosemary and provençal herb. *Food and Chemical Toxicology*. vol.34, n.5, p.449-456.

**Association Française de Normalisation, 2000.** Huiles essentielles: Tome 2, Monographies relatives aux huiles essentielles. 6ème édition. AFNOR, Paris.

**Athemana S., 2009.** Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Mémoire de Magister, Université El-Hadj Lakhdar Batna. 88p.

**Bachrouch O., Mediouni- Ben Jemâa J., Wissem A. W., Talou T., Marzouk B., Abderraba M., 2010.** Composition and insecticidal activity of essential oil from *Pistacia lentiscus* L. against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Stored Products Research. vol.46, p.242-247.

**Balachowsky A. S., 1962.** Traité d'Entomologie Appliquée à l'Agriculture. Vol. 01, p.434-494.

**Barrett P., 1996.** Growing and using lavender. A Storey Country Wisdom Bulletin. US.

**Bärtels A., 1997.** Guide des Plantes du Bassin méditerranéen. Editions Ulmer.

**Baser K., H., C., Gerhard B., 2010.** Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Edition: Taylor & Francis Group, 975p.

**Baytop T., 1999.** Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present). Istanbul: Publications of the Istanbul University, n.3255, p.244–245.

**Beck C. W., Blumer L. S., 2011.** A Handbook on Bean Beetles, *Callosobruchus maculatus*. National Science Foundation, 10p.

**Becker E. M., Nissen L. R., Skibsted L. H., 2004.** European Food Research and Technology, vol.219, p.561.

**Beniston N.T., Beniston W.S., 1984.** Fleurs d'Algérie. Ed. Entreprise nationale du livre, Alger, 359p.

**Berthod A., Billardello B., Geoffroy S., 1999.** Polyphenols in countercurrent chromatography: An example of large scale separation1. Analysis. EDP Sciences, Wiley-VCH, vol.27, p.750-757.

**Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A., 1988.** Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie : Information chimie, n.298, p.179-184.

**Besombes C., 2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques: Applications généralisées. Thèse de Doctorat. Université de la Rochelle, 289p.

**Bilusic V. V., Brantner A. H., Plazibat M., 2007.** Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. Food Chemistry.

**Blackeway J., Salerno M., 1987.** Pour la science. Institut des renseignements scientifiques et techniques, Paris.

- Boelens M. H., 1995.** Chemical and sensory evaluation of *Lavandula* oils. *Perfum and Flavor*, n.20, p.23–51.
- Boutekedjiret C., Bentahar F., Belebbes R., Bessiere J.M., 1998.** The Essential Oil from *Rosmarinus officinalis* L. in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, vol.10, p.680-683.
- Bown D., Hawthorne L., 1997.** *Plantes aromatiques et médicinales*. p.48-50.
- Brown L., Downhower J.F., 1988.** *Analyses in Behavioral Ecology: A Manual for Lab and Field*. Sinauer Associates, 194 p.
- Bruneton J., 1993.** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris, Lavoisier, 623p. (Techniques et Documentation).
- Bruneton J., 1995.** *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Paris, Lavoisier, 915p. (Technique et Documentation).
- Bruneton J., 1999.** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris, Lavoisier, 585p. (Technique et Documentation).
- Burits M., Bucar F., 2000.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, Vol. 14, p.p. 323-328
- Caillard J., 2003.** *Les plantes, des usines chimiques en miniature. Dossier de ressources documentaires*. CRDP Midi-Pyrénées, 6p.
- Campanili E., 1998.** *Dictionnaire de la phytothérapie et des plantes médicinales*. Techniques Nouvelles. p.421-424.
- Caswel G. H., 1960.** Observation on an abnormal form of *Callosobruchus maculatus* (F.). *Bulletin of Entomology Research*, vol.50, p.671-680.
- Cavalli J. F., 2002.** Caractérisation par C.P.G. /K., C.P.G. /S.M. et R.M.N. du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de doctorat, Université de Corse, France, 261 p.
- Cavero S., Jaime L., Martin-Álvarez P. J., Señoráns F. J., Reglero G. Ibañez E., 2005.** In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from Rosemary

(*Rosmarinus officinalis* L). European Food Research and Technology, n.221, p.478-486.

**Chu C. J., Kemper K. J., 2001.** Lavender (*Lavandula* spp.). Longwood Herbal Task Force. 32p.

**Cicile J.C., 1994.** Distillation, Absorption 1. Généralités sur les colonnes de fractionnement. Techniques de l'ingénieur, J2621, 3p.

**Cicile J.C., 2002.** Distillation. Absorption Etude Pratique. Techniques de l'ingénieur J 2610, 20p.

**Conner D.E., 1993.** Naturally occurring compounds: antimicrobials in foods.

**Cowan M. M., 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, n.4, vol.12, p.564–582.

**Croguennec T. et al., 2006.** Science des aliments: Stabilisation biologique et physico-chimique. Paris, Lavoisier, 382p. (Technique et Documentation).

**Crouzet J., 1998.** Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés, p1-18p.

**Daly H.V., Doyen J.T., Purcell A.H., 1998.** Introduction to Insect Biology and Diversity, 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford, New York.

**Delobel A. et Tran M. 1993.** Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes. Ed. ORSTOM Paris, 25 p.

**Delobel, A., Tran, M. & Sembène, M. 2000.** Influence du choix alimentaire sur la fécondité et le développement larvaire des Caryedon des Légumineuses (Coleoptera: Bruchidae) au Sénégal. Annales de la Société Entomologique de France, vol.36, p.61-73.

**De Maak F., Sablier M., 1999.** Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Techniques de l'ingénieur, Traité Analyse et Caractérisation, PE 2614, 18p.

**Del Baño M. J., Lorente J., Castillon J., Benavente-Gracia O., Marin M. P., Del Rio J. O., Ortuño A., Ibarra I., 2004.** Flavonoid distribution during the developpement of

leaves, flowers, stems and roots of *Rosmarinus officinalis*, postulation of a biosynthetic pathway. Journal of Agricultural and Food Chemistry, n.16, vol.52, p.4987-4992.

**Deshpande S. S., Deshpande U. S., Salunkhe D. K., 1995.** In Food Antioxidants, New York, Basel, Hong Kong, 361p.

**Ebrahimzadeh M. A., Pourmmorad F., Hafezi S. 2008.** Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish Journal of Biology. vol.32, p.43-49.

**Eisenhut M., 2007.** The toxicity of essential oils. International Journal of Infectious Diseases. n.11, p.365-375.

**Elbadry E. A., Ahmed M. Y. Y., 1975.** Effects of gamma radiation on the egg stage of southern cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* F. Entomology, vol.79, p.323-328.

**Elena G. K. A., Milen I. G., Mladenka P. I., Leif H. S., Anja R., Mogens L. A., 2008.** Extracts of plant cell cultures of *Lavandula vera* and *Rosa damascena* as sources of phenolic antioxidants for use in foods. European Food Research and Technology. vol.227, p.1243-1249.

**Enan E., 2000.** Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. vol.130, p.325-337.

**Enan E., 2005.** Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. Insect biochemistry and molecular biology. vol.35, p.309-321.

**Esiyok D. et al., 2004.** Herbs as a Food Source in Turkey. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. n.5, p.334-339.

**Fadel O., Ghazi Z., Mouni L., Benchat N., Ramdani M., Amhamdi H., Wathelet J.P., Asehraou A., Charof R., 2010.** Comparison of Microwave-Assisted Hydrodistillation and traditional hydrodistillation methods for the *Rosmarinus eriocalyx* essential oils from eastern Morocco. Journal of Matters in Environment Science. n.2, vol.2, p.112-117.

**Farhat A., 2010.** Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, 136p.

**Ferhat M.A., 2007.** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes des huiles essentielles des Citrus d'Algérie: Compréhension, Application et Valorisation. Thèse de l'Université des Sciences et Technologie Houari Boumediene, Faculté de Chimie, Algérie.

**Fiorenzuoli F., 2000.** Les 100 herbes du Salut. Techniques Nouvelles, p.196-197.

**Flamini G., Cioni P. L., Morelli I., Macchia M., Ceccarini L., 2002.** Main agronomic productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. n.50, p.3512-3517.

**Fleurat Lessard F., 1980.** Enquête sur l'état sanitaire des stocks des grains en France. 2<sup>ème</sup> partie : les résultats. Bulletin technique d'information du Ministère de l'Agriculture. n.349, p.271-280.

**Fouché J. G., Marquet A., Hambuckers A., 2000.** Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman.

**Gakuru S., Foua-Bi K., 1995.** Compared effect of four plant essential oils against cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* F. and rice weevil L. tropical. vol.13, p.143-146.

**Gamez M. J., Jimenez J., Risco S., Zarzuelo A., 1987.** Hypoglycemic activity in various species of genus *Lavandula* Part I: *Lavandula stoechas* L. and *Lavandula multifida* L. Pharmazie, n.42, p.706–707.

**Garcia V. M. C., Garcia V. I., Negueruela, A., 1989.** Essential oils of genus *Lavandula* L. in Spain. Proceedings ICEOFF 1989 New Delhi, 4, 15–26.

**Gardès-Albert M., Jore D., 2005.** Radicaux Libres et Stress Oxydant. Aspects Biologiques et Pathologiques, Editions TEC & DOC, Lavoisier: Paris.

**Garnero J., 1996.** Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur, Traité Constantes physicochimiques, K345, 39p.

- Gbolade A. A., Onayade O. A., Ayinde B. A., 1999.** Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* . volatile oil against *Callosobruchus maculatus* F. in seed treatment and fumigation laboratory tests. *Insect Sciences and its application*, n.19, vol.2-3, p.233-235.
- Gershenson, J., Croteau R., 1992.** Terpenoids in Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites Academic Press, San Diego, CA, vol. 1, p. 165–219.
- Gilani A. H., Aziz N., Khan M. A., Shaheen F., Jabeen Q., Siddiqui B. S., Herzig J. W., 2000.** Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L. *Journal of Ethnopharmacology*, n.71, p.161–167.
- Giray E. S., Kirici S., Kaya A. D., Turk M., Somnez O., Inan M., 2008.** Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta*, n.74, p-930-935.
- Glitho, I. A., Nuto Y., 1987.** Etude des fluctuations des populations de Bruchidae dans les stocks de *Vigna unguiculata* au Togo et au Bénin. In Proceedings of «Les Légumineuses alimentaires en Afrique», Université de Niamey, Niger, p.224-229.
- Grundschober F., 1991.** The identification of individual components in flavorings and flavoured foods, *Lebensm Unters Forsch*, vol.192, p.530-534.
- Guenther E., 1974.** The essential oils. Edition: Robert Krieger publishing co Huntington, New York, vol.3, p.777.
- Guignard J., 1996.** Les composés phénoliques. Edition : Masson, (Biochimie Végétale). p.174-192.
- Guignard J., 2000.** Les composés aromatiques, Edition: Dunod, p.174-176. (Biochimie Végétale).
- Gulcin I., Sat I. G., Baydemir S., Elmastas M., Kufrevioglu O. I., 2004,** Food Chemistry. vol.87, p.393.
- Halliwell B., Gutteridge. J. M. C., 1999.** In Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science: Oxford, 36p.

- Harborne J.B., 1989.** General procedures and measurement of total phenolics in: methods in Plant Biochemistry, p.1-28.
- Hartnoll G., Moore D., Douek D., 1993.** Near fatal ingestion of oil of cloves. Arch Dis Child. n.69, p.392-394.
- Harzfeld P.W., Forkner R., Hunter M.D., Hagerman A.E., 2002.** Determination of hydrolysable Tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, n.50, p.1785-1790.
- Haslam E.T., 1998.** Bitterness and Astringency. In: Practical polyphenolics (from structure to molecular recognition and physiological action) Cambridge University Press, p.178-225.
- Hassiotis N. C., 2010.** Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavandula stoechas* in Mediterranean region. Biochemical Systematics and Ecology, n.38, p.493-501.
- Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M., 2007.** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chemistry, vol.105, n.3, p.1126-1134.
- Hekal A. M., El-Kady E. A., 1987.** Effect of gamma radiation on the level of infestation with *Callosobruchus maculatus* (F.) in stored cowpea seeds. Agricultural Science., Egypt n.32, vol.3, p.1689-1698.
- Hemingway R.W., 1992.** Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Plant polyphenols: synthesis, properties, significance. **Hemingway R.W.**, Laks P. E. New York.
- Heong K. L., 1981.** Searching preference of the parasitoid, *Anisopteromalus calandrae* (Howard) for different stages of the host, *Callosobruchus maculatus* (F.) in the laboratory. Research in Population Ecology, vol.23, p.177-191.
- Herrmann K. M., Weaver, L. M., 1999.** The shikimate pathway. Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. vol.50, p.473-503.

**Hindmarsh P. S., Tyler P. S., Webley D. J., 1978.** Conserving grain on the small farm in the tropics. *Outlook Agric.* n.9, vol.5, p.214-219.

**Hoffmann, A. 1945.** Coléoptères Bruchidae et Anthribidae. In: *Faune de France* (ed. Lechevalier, P.), p.1-184. Paris.

**Homas-Odjo A., Gaspar A., 1994.** Utilisation de *Dinarmus basalis* Rond. (Hymenoptera : Pteromalidae) pour le contrôle de *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera : Bruchidae). *Mended. Fac. Landbouw. Univ. Gent*, p. 451-456.

**Houghton P. J., Ren Y., Howes M. J., 2006.** Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, vol. 23, p.181-199.

**Howe R. W., 1978.** Introduction- The principles and problems of storage and pest control. *Outlook Agric.* n.9, vol.5, p.198-203.

**Ibañez E., Cifuentes A., Crego A. L., Señoráns F. J., Caverro S., Reglero G., 2000.** Combined use of supercritical fluid extraction: Micellar electrokinetic chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol.48, n.9, p.4060-4065.

**Ibañez E., Kubátová A., Señoráns F. J., Caverro S., Reglero G., Hawthorne S. B., 2003.** Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol.51, n.2, p.375-382.

**Iboudo Z., Dabiré L. C. B., Nébié R. C. H., Dicko I. O., Dugravot S., Cortesero A. M., Sanon A., 2010.** Biological activity and persistence of four essential oils towards the main pest of stored cowpeas, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*. vol.46, p.124-128.

**Imelouane B., Elbachiri A., Ankit M., Benzeid H., Khedid K., 2009.** Physico-Chemical Compositions and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Eastern Moroccan *Lavandula dentata*. *International Journal of Agricultural Biology*., vol.11, p.113–118.

**Inderjit, Dakshini, K. M. M., Einhellig F. A., 1995.** Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications. ACS Symposium series American Chemical Society, Washington, DC.

- Isman, 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* vol.19, p.603-608.
- Jacobson M., 1989.** Botanical pesticides: past, present and future. Arnason J.T., Philogene B. J. R., & Morand P., eds. *Insecticides of plant origin*. ACS Symposium Series, Washington DC USA vol.384, p.1-10.
- James S. E., Price C.S., Thomas D., 2005.** Essential oil poisoning: N-acetyl cysteine for eugenol-induced hepatic failure and analysis of a national database. *European Journal of Pediatrics* n.164, p.520-522.
- Jin H., Martin C. 1999.** Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol. Biol.* vol.41, p.577-585.
- Johnson C.D, Siemans D.H., 1991.** Expanded oviposition range by a seed beetle in proximity to a normal host. *Environmental Entomology* vol.20, p.1577-1582.
- Johnson C.D., 1981.** Seed beetle host specificity and the systematics of the Leguminosae. In: *Advances in Legume Systematics* (eds. Polhill, R.M. & Raven, P.H.), The Royal Botanic Gardens, Kew, p.995-1027.
- Johnson C.D., 1988.** The possible beginning of adaptation to a new host by bruchid beetles in Venezuela. *Biotropica*, vol.20, p.80-81.
- Joulain D., König W. A., 1998.** The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E. B.-Verlag, Hamburg.
- Kapila R., Agarwal H. C., 1990.** Biology, of an egg parasite of *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). In *Proc. 5th Int. Work. Conf. on Stored-Prod.* Paris, Fleurat-Lessard F. et Ducom P., vol.2, p.1265-1273.
- Kaufman P.B., Cseke L.J., Warber S. Duke J.A., 1999.** Natural products from plants: CRC Press LLC.
- Kellouch A., Sotani N., 2003.** Activité biologique des poudres de cinq plantes et de l'huile essentielle d'une d'entre elle sur *Callosobruchus maculatus* F. *Sciences Agronomiques*, p.184-191.

- Kessler A., Baldwin I. T., 2001.** Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, vol.291, p.2141–2144.
- Ketoh, G. K., Glitho, I. A. 2006.** Evolution de quelques paramètres de développement de *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) en conditions de stockage. *Sciences & Nature*, vol.3, p.91–101.
- Ketoh K. G., Koumaglo H. K., Glitho I. A., Huignard J., 2006.** Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* F. développement. *Fitoterapia*, vol.77, p.506–510.
- Kimball D.A., 1999.** Citrus processing: A complete guide, 2<sup>nd</sup> edition, Aspen Publication INC., Maryland, 435p.
- Kingsolver J. M., 2004.** Handbook of the Bruchidae of the United States and Canada (Insecta, Coleoptera). U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin n.1912, vol.1 , 324p.
- Kovar K. A., Gropper B., Friess D., Ammon H. P. T., 1987.** *Planta Medica*, n.53, 315p.
- Kováts E., 1965.** Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System. *Advances in Chromatography*, vol.7, p.229-247.
- Laszlo P., Rivière S., 1997.** *Les Sciences du parfum*. Paris, P.U.F., 128p. (Que sais-je?).
- Laurie W. K., Ntoukam G., 2002.** Le stockage du niébé dans le cendre. Institut de Recherche Agronomique du Cameroun. Projet de stockage, Niébé. 11p.
- Lee Y. W., Lee Y. Y., 2003.** Extraction optimization in food engineering, Flavor and Aroma Substances. Korea Institute of Science and Technology Seoul, Korea. 923p.
- Lepesme P., 1944.** Les coléoptères des denrées alimentaires et des produits industriels enreposés. *Encyclopédie entomologique*. Ed. Lechevalier, Paris.
- Lichtenthaler H. K., 1999 .**The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol.50, p.47-65.

- Logemann E., Parniske M., Hahlbrock K., 1995.** Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5905–5909.
- Lucchesi E.M., 2005.** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes: Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat, Université de la Réunion. 143p.
- MacDonald-Wicks L. K., Wood L. G., Garg M. L., 2006.** *Journal of Food Science*, vol.86, p.2046.
- Maganga A., 2004.** Influence of Variety and Organic Cultural Practices on Yield and essential oil content of lavender and rosemary in Interior BC. (STOPA). *Ecorational Technologies. Kamloops. BC.* 23p.
- Makhlouf H., 2002.** Les huiles essentielles du romarin et du clou de girofle : approche analytique et activité antioxydante sur une huile alimentaire. Mémoire d'ingénieur., INA. El-Harrach, 70 p.
- Maria L. B., 2002.** Lavender: The genus *Lavandula*. Medicinal and aromatic plants – industrial profiles. Taylor & Francis. vol.29, 268p.
- Martini M.C., Seiller M., 1999.** Actifs et additifs en cosmétologie. Editions Tec & Doc, Paris, 102p.
- Mayer G. B., 1989.** Produits PFI- CO<sup>2</sup>, une nouvelle génération de produits pour l'alimentation extraits au CO<sub>2</sub>. *Industries Agro-Alimentaires*, p.847-853
- McLafferty F. W., Stauffer D.B., 1989.** The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 1-7, A Wiley-Interscience Publication, Edition John Wiley & Sons, New York.
- Meyer-Warnod B., 1984.** Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils. *Perfumer and Flavorist*, vol.9, p.93-103.
- Miguel. M. G, 2010.** Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal.* n.25, p-291-312.

- Mohammedi Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 105p.
- Moharramipour S., Taghizadeh A., Meshkatsadat M. H., Talebi A. A., Fathipour Y., 2008.** *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, vol.73, p.639.
- Mompon B., Lemaire B., Mengal P., Surbled M., 1998.** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Polyphénols 96. Bordeaux France, 15-16 Juillet 1996. Ed. INRA, Paris (Les Colloques, n°87).
- Monge J. P., Ouedraogo A. P., Huignard J., 1990.** Development of two bruchid species *Bruchidius atrolineatus* (Pic) and *Callosobruchus maculatus* (F.) and their larval parasitoids during storage of cowpea seeds *Vigna unguiculata* (Walp) in West Africa. In Proc. 5th Int. Work. Conference on Stored- Prod. Paris, Fleurat-Lessard F. et Ducom P., vol.1, p.151-160.
- Nadkarni K. M., 1982.** Indian material medica (3<sup>rd</sup> ed.). Bombay: Popular Prakashan p.730.
- Ngmao L.S.T., 2004.** Rapport technique (Septembre 2003-Février 2004), Projet interuniversitaire ciblé (PIC), 34p.
- Novak, J., 2005.** Lecture held on the 35th International Symposium on Essential Oils, Giardini Naxos, Sicily.
- Nyamador W., 2009.** Influence des traitements à base d'huiles essentielles sur les capacités de reproduction de *Callosobruchus subinnotatus* Pic. et de *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera : Bruchidae) : Mécanisme d'action de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov. Thèse de Doctorat. Université de Lomé. 177p.
- Offord E. A., Macé K., Ruffieux C., Malnoë A., Pfeifer A. M., 1995.** Rosemary components inhibit benzo [a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*. vol.16, n.9, p.2057-2062.
- Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K., Yaghi A., 1994.** Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*. vol.37, n.5, p.1463-1466.

**Ouedraogo P. A., 1978.** Etude de quelques aspects de la biologie de *Callosobruchus maculatus* F. (Coléoptère, Bruchidae) et de l'influence des facteurs externes stimulants (plante hôte et copulation) sur l'activité reproductrice de la femelle. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse. 101p.

**Ouedraogo P. A., 1991.** Le déterminisme du polymorphisme imaginal chez *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera : Bruchidae). Importance des facteurs climatiques sur l'évolution des populations de ce Bruchidae dans un système expérimental de stockage de graines de *Vigna unguiculata* Walp. Thèse de Doctorat ès Sciences Univ. F. Rabelais Tours, 117 p.

**Ouedraogo P. A., Sou S., Sanon A., Monge J. P., Huignard J., Tran B., Credlang P. F. 1996.** Influence of temperature and relative humidity on population of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Pteromalidae) in two climatic zones of Burkina Faso. *Bulletin of Entomology Research.*, vol.86, p.695–702.

**Outaleb T., 2009.** Huiles essentielles et extraits de romarin : composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne. Thèse de Magister. ENSA El-Harrach Alger. 112p.

**Oyaizu M., 1986.** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, vol.44, 307-315.

**Özcan M., Akgül A., 1995.** *Acta Aliment.* n.24, p.81.

**Paradiso A., Cecchini C., De Gara L. et D'Egidio M. G., 2006.** Functional, antioxidant and rheological properties of meal from immature durum wheat. *Journal of Cereal Science*, vol.43, n.2, p.216-222.

**Paris A., Strukelj B., Renko M., Turk V., Pukl M., Umek A., Korant B. D. 1993.** Inhibition effects of carnosic acid on HIV-I protease in cell free assays. *Journal of natural products.* vol.56, n.8, p.1426-1430.

**Parry J.W., 1969.** *Spices*, NY: Chemical Publishing Co., vol.1 and 2.

**Pascual-Villalobos M. J., Ballesta-Acosta M. C., 2002.** Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemical Systematics and Ecology.* vol.31, p.673-679.

- Pibiri M.C., 2005.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen des huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. 159p.
- Platzer N., 2002.** Application de la RMN à la détermination des structures. Techniques de l'ingénieur, Traité Analyse et caractérisation, 18p.
- Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., 2000.** Antioxydants in food : practical applications. Woodhead Publishing, 388p.
- Pokorny J., et al., 2003.** Lipides et corps gras alimentaires. Paris, Lavoisier, 380p. (Technique et Documentation)
- Prashar A., Locke I. C., Evans C. S., 2004.** Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. Cell Prolif n.37, p.221-229.
- Prevelt P. F., 1961.** Field infestation of cowpea (*Vigna unguiculata*) pods by beetles of the families Bruchidae and Curculionidae in Northern Nigeria. Bulletin of Entomology Research, vol.52, p.635-645.
- Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris, CNRS, Tome 1 et 2, 1170p.
- Rajapeske R. S. H., 1996.** The effect of four botanicals on the oviposition and adult emergence of *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). Entomol vol.21, p.211-215.
- Ramirez P., Señoráns F. J., Ibañez E., Reglero G., 2004.** Separation of Rosemary antioxidants compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns. Journal of Chromatography. n.1057, p.241-245.
- Rasooli I., Rezaei M. B., Allameli A., 2006.** Ultrastructural studies on anti-microbial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. International Journal of Infectious Diseases. n.10, p.236-241.
- Regnault-Roger A., et Hamraoui A., 1995.** Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say)

(Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Stored Prod. Res. 31 : 291-299.

**Ribereau-Gayon, P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux : notion générales sur les composés phénoliques, édition Dunod, Paris, p.88-89-318-330.

**Ristorcelli D., Tomi F. Casanova J., 1998.** <sup>13</sup>C-NMR as a tool for identification and enantiomeric differentiation of major terpenes exemplified by the essential oil of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas*. Flavour and Fragrance Journal, vol.13, p.154-158.

**Roccabruna L., 2003.** Il rosmarino, un'aromatica per il palato e il benessere dell'organismo. Vita in Campagna n.10, p.24-26.

**Rojas-Rousse D., Kalmes R., Combescot C., Eslami J. et Gomez-Alvarez L., 1988.** Bilan nutritionnel au cours du développement de l'ectoparasite grégaire *Dinarmus vagobundus* et du solitaire *Dinarmus basalis*. Entomology Application, p.70.

**Sahin F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G. et Özer H., 2004.** Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control. vol.15, p.549-557.

**Sahraoui N., Hellal A., Boutekedjiret C., Bentahar F., Bessièrè J.M., 2007.** Antimicrobial activities of essential oil of some Algerian aromatic plants. International Journal of essential Oil Therapeutics, vol.1, p.83-90.

**Salem H., Degheele D., 1988.** Influence of gamma – irradiation on the ultrastructure of the testes of southern cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). Parasitica, vol.44, p.59-70.

**Sánchez-Moreno C., 2002.** Food Science and Technology, vol.8, p.121.

**Sandberg S. L., Berenbaum M. R., 1989.** Leaf-tying by tortricid larvae as an adaptation for feeding on phototoxic *Hypericum perforatum*. Journal of Chemistry and Ecology, vol.15, p.875–886.

- Scartezzini F., 2001.** Il tempo dei Rosmarini Influenza dell'epoca di raccolta sul contenuto e la composizione dell'olio essenziale di due cloni di rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L.) coltivati in Trentino. *Erboristeria domain*, n.10, p.42-46.
- Sharma S., Sangwan N. S., Sangwan R. S., 2003.** Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current Science*, vol. 84, p. 4-25, 544-550.
- Sidi Boulenouar K., Ziane A., 2003.** Etude phytochimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. de la région de Tlemcen. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études supérieures en biologie. Option : Biochimie. Faculté des Sciences. Université. ABB. Tlemcen.
- Sierra M.J., Millan R., Esteban E., 2009.** Mercury uptake and distribution in *Lavandula stoechas* plants grown in soil from Almadén mining district (Spain) .*Food and Chemical Toxicology*. n.47, p.2761-2767.
- Singh N., Luthra P., Sangwan R.S., Thakur R.S., 1989.** Metabolism of monoterpenoids in aromatic plants. *Curr. Res. Med. Arom. Plants* , vol.11 p.174- 197.
- Singh S. R., Jackai L. E. N., Dos Santos J. H. R., Adalla C. B., 1990.** Insect pests of cowpea. In *Insect Pests of Tropical Food Legumes*, Edition. Singh S. R., Chichester, Wiley, p.43-49.
- Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., 2003.** Principes d'analyse instrumentale. Paris, De Boeck université, p.956.
- Southgate B. J., 1978.** Pests of grain legumes: Ecology and control. Press, New York p.225-227.
- Sultan G. E., Saliha K., Alpaslane K. D., Murat T., Ozgur S., Memet I., 2008.** Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. Elsevier, n.74, p.930-935.
- Suthisut D., Fields, P.G., Chandrapatya. A., 2011.** Fumigant toxicity of essential oils from three Thai plants (Zingiberaceae) and their major compounds against *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* and two parasitoids. *Journal of Stored Products Research*. vol.47, p-222-230.

- Taiz L., Zeiger E., 2002.** Plant physiology. Sinauer Associates; Third Edition. 690p.
- Teuscher E., Anton, R., Lobstein A. 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Lavoisier, éditions Tec & Doc, Paris.
- Thomas-Odjo A., Gaspar A., 1994.** Utilisation de *Dinarmus basalis* Rond. (Hymenoptera : Pteromalidae) pour le contrôle de *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera : Bruchidae). Mended. Fac. Landbouw. Univ. Gent. p.451-456.
- Tranchant J., 1999.** Chromatographie en phase gazeuse. Techniques de l'Ingénieur, Traité Analyse et caractérisation, 7p.
- Turgeon M., 2001.** Profil des produits forestiers - première transformation: huiles essentielles. Québec, Ministère des Ressources naturelles - Direction du développement de l'industrie des produits forestiers, 16p.
- Turlings T. C. J., Loughrin J. H., McCall P. J., Rose U. S. R., Lewis, W. J., Tumlinson J. H., 1995.** How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: p.4169-4174.
- Upson T., 1992.** In search of Rosemary: A field trip to southern Spain.
- Upson T. M., Grayer R. J., Greenham J. R., Williams C. A., Al-Ghamdi F., Chen F. H., 2000.** Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. Biochemical Systematics and Ecology. n.28, p.991-1007.
- Usmanghani K., Saeed A., Alam M. T., 1997.** Indusynic medicine. Karachi: University of Karachi Press. p.273.
- Utida S., 1954.** Phase dimorphism observed in the laboratory population of the cowpea weevil, *Callosobruchus quadrimaculatus*. Japanese J. Appl. Zool. 18, 161-168.
- Utida S., 1981.** Polymorphisme in *Callosobruchus maculatus* F. in proceeding of the international symposium on the ecology of bruchids attacking legumes (pulses). Tours. Eds Labeyrie. Series. Entomology, p.143-147.
- Van Den Dool H., Kratz P.D., 1963.** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J. Chromatog. Vol.11, p.463-471.

**Van Huis A., 1991.** Biological methods of bruchid control in the tropics: A review. *Insect Science Application*. n.12, vol. 1/2/3, p.87-102.

**Vinatoru M., 2001.** An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonic Sonochemistry* vol.8, p.303-313.

**Wiesenfeld E., 1999.** Aroma profiles of various lavandula species, Noville, South Hackensack, NJ, USA, <http://www.sisweb.com/referenc/applnote/noville.htm>

**Wink M., 2003.** Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, vol.64, p.3-19.

**Yang R. Y., Lin S., Kuo G., 2008.** Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. *Asia of pacific journal of clinical nutrition*. n.17, p.275-279.

**Zannou E. T., 2000.** Analyse de quelques paramètres biologiques pour une meilleure connaissance des capacités reproductrices d'une souche béninoise de *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera : Bruchidae) : caractérisation et importance de la diapause reproductrice chez les femelles du morphe voilier. Thèse de Doctorat. Université de Bénin Lomé, Togo, 122 p.

**Zeghad N., 2009.** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister, Université de Constantine. 96p.

**Ziemons E., 2007.** Etude en temps réel du processus d'extraction de la Tagitinine C en fonction des caractéristiques physico-chimiques du CO<sub>2</sub> supercritique à l'aide de fibres optiques couplant un spectrophotomètre IRTF à un extracteur à fluide supercritique. Thèse de doctorat, Université de Liège, 159p.

## Résumé:

Les huiles essentielles de la lavande (*Lavandula stoechas*) et du romarin (*Rosmarinus eriocalyx*) ont été extraites par hydrodistillation. Les rendements obtenus pour 100 g de matière végétale fraîche sont de **0,16 ml** pour la lavande et de **1,6 ml** pour le romarin.

L'analyse par CPG et CPG/SM des huiles essentielles a révélé des compositions chimiques très différentes pour les deux plantes. Le fenchone est le composé majoritaire de l'huile essentielle de lavande (**11%**) tandis que l'huile essentielle de romarin est dominée par le camphor (**39,4%**). Les extraits éthanoliques des plantes étudiées ont enregistré des rendements de **19,29** et **30,59%** pour *L. stoechas* et *R. eriocalyx* respectivement. Ces extraits possèdent des teneurs élevées en polyphénols et flavonoïdes.

L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits éthanoliques a montré que les extraits éthanoliques possèdent un fort pouvoir antioxydant par rapport à celui des huiles essentielles et du BHT. La teneur élevée en composés phénoliques serait à l'origine de cette capacité réductrice importante. L'évaluation de l'activité insecticide des huiles essentielles étudiées a montré qu'elles possèdent un fort effet toxique vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus*, ces dernières ont entraîné la mort des adultes de cet insecte, une réduction significative de la fécondité des femelles et de la fertilité des œufs pondus.

**Mots clés:** *Lavandula stoechas*, *Rosmarinus eriocalyx*, huile essentielle, extrait éthanolique, antioxydant, insecticide, *Callosobruchus maculatus*, CPG/CPG-SM.

## Abstract :

Essential oils of lavender (*Lavandula stoechas*) and rosemary (*Rosmarinus eriocalyx*) were extracted by hydrodistillation. The yields obtained for 100 g fresh weight are **0.16 ml** for the lavender and **1.6 ml** for rosemary.

The analysis of essential oils by CG and CG/MS revealed very different chemical compositions for the two plants. The fenchone is the majority compound of the essential oil of lavender (**11%**) while the essential oil of rosemary is dominated by the camphor (**39.4%**). The ethanolic extracts of the studied plants recorded yields of **19.29** and **30.59%** for *L. stoechas* and *R. eriocalyx* respectively. These extracts have high percentages of polyphenols and flavonoids.

The evaluation of the antioxidant activity of essential oils and ethanolic extracts was showed that the ethanolic extracts have a strong antioxidant capacity compared to that of essential oils and the BHT. The high percentage of phenolic compounds would be at the origin of this significant reducing capacity. The evaluation of the insecticidal activity of studied essential oils showed that they have a strong toxic effect to

*Callosobruchus maculatus*, these last caused death of the adults of this insect, a significant reduction of the fruitfulness of the females and fertility of laid eggs.

### Keywords :

*Lavandula stoechas*, *Rosmarinus eriocalyx*, essential oil, ethanolic extract, antioxidant, insecticidal, *Callosobruchus maculatus*, CG/CG-MS.

### ملخص:

تم استخلاص الزيوت الأساسية للحلحال *Lavandula stoechas* و الإكليل *Rosmarinus eriocalyx* بواسطة تقنية التقطير المائي. المردود المحصل عليه لكل 100 غ من المادة النباتية الرطبة هو 0,16 مل و 1,6 مل تباعا. تحليل الزيوت الأساسية بواسطة CPG و CPG/SM أظهر تركيبتين كيميائيتين مختلفتين للنباتين. *fenchone* هو المركب الرئيسي للزيت الأساسية للحلحال بنسبة 11% في حين أن الزيت الأساسية للإكليل تملك *camphor* كمركب رئيسي بنسبة 39,4%.

استخراج المستخلصات الايثانولية للنباتين المدروستين أظهر مردودا يقدر ب 19,29% بالنسبة للحلحال و 30,59% للإكليل. أظهرت معايرة المركبات الفينولية أن المستخلصات المدروسة تملك نسبا معتبرة من البوليفينول و الفلافونويدات.

تقييم النشاط المضاد للأكسدة للزيوت الأساسية و المستخلصات المدروسة أظهر قدرة ارجاعية مرتفعة للمستخلصات مقارنة مع الزيوت الأساسية و مركب BHT. هذا النشاط يعود الى محتواها المرتفع من المركبات الفينولية. دراسة نشاط الزيوت الأساسية ضد الحشرات أظهر أنها تملك فعالية كبيرة ضد

*Callosobruchus maculatus* حيث أنها سببت موت الحشرة, تخفيض خصوبة الاناث و عدد البيوض المقفوسة.

### الكلمات المفتاحية:

*Lavandula stoechas* , *Rosmarinus eriocalyx* , الزيت الاساسية , المستخلص الايثانولي, مضاد للأكسدة, مبيد للحشرات, *Callosobruchus maculatus* , CPG/ CPG-SM