

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

Thèse

Présentée pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Option : Sciences alimentaires

THEME

Contribution à l'étude phytochimique et biologique de l'érigeron, du fenouil commun, de la lavande et du genévrier.

Présentée par : MENACEUR Fouad

Soutenue le : 15-03-2015

Jury :

Président:	Mme FERHAT Z.	Professeur (ENSA)
Directeur:	M. HAZZIT M.	Maître de Conférences A (ENSA)
Examineurs:	M. ZOUGGAGHE F.	Maître de Conférences A (Univ. Bouira)
	M. MOUNI L.	Maître de Conférences A (Univ. Bouira)

Année universitaire : 2014-2015

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 Monsieur **ZOUGGAGHE Fatah**, Maître de Conférence à l'Université de Bouira pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent à Monsieur **MOUNI Lotfi**, Maître de Conférence à l'Université de Bouira pour avoir eu l'amabilité d'examiner ce travail.*

Sommaire

Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	4
Chapitre 1 : Les huiles essentielles	4
Introduction	4
1. Historique	4
2. Définitions.....	5
3. Localisation et lieu de synthèse.....	5
4. Voies de biosynthèse	7
5. Rôles physiologiques	8
6. Techniques d'extraction des huiles essentielles	10
7. Conservation des huiles essentielles	15
8. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	15
9. Traitement des huiles essentielles	15
10. Analyse des huiles essentielles	16
11. Composition chimique des huiles essentielles	20
12. Toxicité des huiles essentielles	23
13. Utilisations	23
Chapitre 2 : Les composés phénoliques	25
Introduction	25
1. Mécanisme général de la biosynthèse des composés phénoliques	25
2. Classification des composés phénoliques	26
3. Utilisation des polyphénols	33
4. Toxicité des produits phénoliques	33
Chapitre 3 : Monographie des espèces étudiées	35
1. La lavande	35
2. L'aneth	40
3. L'érigéron	45
4. Genévrier de Phénicie:	40
5. Etude bioécologique de <i>Callosobruchus maculatus</i>	50

Chapitre 4 : Oxydation et antioxydants.....	61
Introduction	61
1. Substrats lipidiques	61
2. Phénomène d'oxydation des lipides	61
3. Les antioxydants	67
 Chapitre 5 : Activité antimicrobienne.....	76
Introduction	76
1. Principaux agents antimicrobiens.....	76
2. Détermination de l'activité antimicrobienne.....	77
3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne	80
4. Les propriétés des agents antimicrobiens.....	81
5. Propriétés antibactériennes des HE.....	83
6. Mode d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants.....	85
7. Comparaison entre les antibiotiques et les huiles essentielles	86
8. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	88
7. Comparaison entre les antibiotiques et les huiles essentielles	86
7. Comparaison entre les antibiotiques et les huiles essentielles	86
 Partie expérimentale.....	90
Chapitre 1 : Matériels et méthodes	90
1. Matériel végétal.....	90
2. Matériel entomologique.....	90
3. Matériel microbiologique.....	92
4. Extraction des huiles essentielles	93
5. Extraits éthanoliques	96
6. Coupes anatomiques.....	97
7. Caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques des huiles essentielles	97
8. Analyse des huiles essentielles.....	98
9. Analyse chimique des extraits éthanoliques	101
10. Activité biologique des huiles essentielles et extraits étudiées.....	102
10.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	102
10.2. Estimation de l'activité insecticide sur <i>Callosobruchus maculatus</i> F	104
10.3. Evaluation activité antimicrobienne	108

Chapitre 2 : Résultats et discussions	115
1. Localisation des sites producteurs des huiles essentielles.....	115
2. Rendements des extractions.....	118
3. Caractérisation chimique des huiles essentielles et extraits	128
4. Activité biologiques des extraits volatils et non-volatils étudiés	164
I. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'aneth.....	164
II. Activité insecticide de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i>	167
III. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et extraits étudiés ..	175
Conclusion générale.....	188
Références bibliographiques.....	191

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
- **CO₂**: Dioxyde de Carbone
- **CMB**: Concentration Minimale Bactéricide
- **CMI**: Concentration Minimale Inhibitrice
- **CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse
- **CPG/SM** : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse
- **d** : Densité relative :
- **DL₅₀** : 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'Immunodéficiency Humaine (VIH)
- **HR** : Humidité Relative
- **I(%)** : Pourcentage d'inhibition ou activité antioxydante
- **IC₅₀** : 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
- **TL₅₀** : Temps léthal pour 50% de la population
- **t_R** : Temps de rétention :
- **UV** : Ultra Violet
- **V** : Volume
- **α** : Alpha
- **β** : Beta
- **γ** : Gamma
- **λ** : Lamda
- **o**: Ortho

Liste des figures

Figure 1: Structure de l'isopentane	6
Figure 2: Structure de l'isoprène	6
Figure 3 : Schéma de la voie de l'acide mévalonique	7
Figure 4 : Schéma de la voie du DMAPP.....	9
Figure 5 : Biosynthèse des composés terpéniques.....	10
Figure 6: Structure de quelques monoterpènes.....	21
Figure 7: Exemples de sesquiterpènes entrant dans la composition chimique des huiles essentielles.....	21
Figure 8: Structures de quelques dérivés du phénylpropanoïde	22
Figure 9: Schéma général des principales voies de biosynthèse des composés phénoliques	27
Figure 10: Exemples de phénylpropanoïdes simples.....	28
Figure 11: Exemples de coumarines	28
Figure 12: Exemples de dérivés de l'acide benzoïque.....	29
Figure 13: Structure de l'acide gallique et l'acide ellagique	30
Figure 14: Structure de base des tannins condensés	31
Figure 15: Structure du squelette de base des flavonoïdes	32
Figure 16: <i>Lavandula stoechas</i> L.1753.....	38
Figure 17: <i>Anethum graveolens</i> L.....	42
Figure 18: <i>Juniperus phoenicea</i> L. 1753	48
Figure 19: Schéma d'une vue dorsale du mâle et de femelle de <i>C. maculatus</i> (Brown et Downhower, 1988).....	54
Figure 20: Cycle biologique de <i>C. maculatus</i> en conditions optimales (Laurie et Ntoukma, 2002).	55
Figure 21: Phase d'initiation.....	62
Figure 22: Phase de propagation.....	63
Figure 23: Formation des produits secondaires par la décomposition des hydroperoxydes.....	64
Figure 24: Phase de terminaison.....	65
Figure 25: 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).....	65

Figure 26: Photo-oxydation type 1	66
Figure 27: Photo-oxydation type 2	67
Figure 28: Structure de quelques antioxydants de synthèse	69
Figure 29: Structure des tocophérols	71
Figure 30: Structure de l'acide ascorbique	71
Figure 31: Illustration de la méthode des microatmosphères	78
Figure 32: Schéma simplifié du principe de la méthode des aromagrammes.	79
Figure 33: Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).	86
Figure 34: L'élevage de <i>Callosobruchus maculatus</i> F. dans des bocaux en verre à l'intérieur de l'étuve.....	90
Figure 35: Montage de l'appareil de Clevenger-modifié.....	93
Figure 36: Montage de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes.....	94
Figure 37: Schéma du montage de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes. ..	95
Figure 38: Montage de l'appareil de Soxhlet.....	97
Figure 39: Structure de l'acide gallique.....	101
Figure 40: Protocole de mise en œuvre du test du pouvoir réducteur.	103
Figure 41 : Traitement des insectes par les huiles essentielles pour le test inhalation ..	105
Figure 42: Principe de la méthode de diffusion par disque.	109
Figure 43: Méthode de détermination de la CMI en milieu solide.	113
Figure 44: Coupe transversale du fruit de <i>Juniperus phoenicea</i> L. montrant la présence d'un canal sécréteur (Gr. : X 80)	115
Figure 45: Coupe transversale de la feuille de <i>Juniperus phoenicea</i> mettant en évidence la présence des canaux sécréteurs et des gouttelettes d'huile essentielle (Gr. : X160).....	116
Figure 46: Coupe transversale du fruit d' <i>Anethum graveolens</i> montrant la présence d'un canal sécréteur (CS) (Gr.: 12.5 x 3.2).....	116
Figure 47: Coupe transversale de la tige d' <i>Anethum graveolens</i> montrant la présence d'un canal sécréteur (CS) (Gr. : 25 x 3.2).....	116
Figure 48: Coupe transversale de la tige de <i>L. stoechas</i> mettant en évidence les poils tecteurs (PT) et sécréteurs (PS) (Gr.: X 80).....	117
Figure 49: Coupe transversale d'une feuille de <i>L. stoechas</i> mettant en évidence les poils tecteurs (PT) et sécréteurs (PS) (Gr.: X 80).....	118
Figure 50: Schéma d'un poil tecteur et sécréteur (Camefort, 1972)	118

Figure 51: Cinétique d'extraction de l'HE des fruits de <i>J. phoenicea</i> par HD et ESSAM.	121
Figure 52: Etapes de l'obtention d'une huile essentielle (Lucchesi, 2005)	122
Figure 53: Courbe d'étalonnage des phénols totaux.....	128
Figure 54: Courbe d'étalonnage des flavonoïdes	130
Figure 55: Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir des fruits de <i>Juniperus phoenicea</i> par HD.	136
Figure 56: Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir des fruits de <i>Juniperus phoenicea</i> par ESSAM.....	137
Figure 57: Chromatogramme CPG de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> sur colonne DB-5.....	144
Figure 58: Chromatogramme CPG de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> sur colonne Stabilwax TM	145
Figure 59: Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> sur colonne OV-1	146
Figure 60: Familles chimiques de l'huile essentielle de <i>Lavandula stoechas</i>	147
Figure 61: Principaux composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Lavandula stoechas</i>	147
Figure 62: Chromatogramme de l'HE extraite à partir des fruits d' <i>Anethum graveolens</i>	149
Figure 63: Histogramme des différents constituants d' <i>Anethum graveolens</i>	151
Figure 64: Les différentes classes chimiques composant l'HE de l'aneth.	151
Figure 65: Histogramme des constituants majoritaires d' <i>Anethum graveolens</i>	152
Figure 66: Chromatogramme en GC-MS de l'huile essentielle de <i>Conyza canadensis</i> (les numéros sur les pics correspondent aux numéros d'ordre du tableau de la composition chimique ; NI : non identifié).....	157
Figure 67: Les pourcentages des familles des composés déterminés dans l'HE de l'érigéron.....	158
Figure 68: Structure chimique du (Z,E)-Matricaria ester.	159
Figure 69: Zone d'inhibition de l'huile essentielle de l'aneth testée sur <i>Bacillus subtilis</i>	162
Figure 70: Zone d'inhibition de l'huile essentielle de l'aneth testée sur <i>Staphylococcus aureus</i>	162

Figure 71: Zone d'inhibition de l'huile essentielle de l'aneth testée sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	163
Figure 72: Zone d'inhibition de l'huile essentielle de l'aneth testée sur <i>Escherichia coli</i> .	163
Figure 73: Zone d'inhibition de l'huile essentielle de l'aneth testée sur <i>Candida albicans</i> .	163
Figure 74: Illustration de la CMI de l'HE de l'aneth vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> .	165
Figure 75: Illustration de la CMI de l'HE de l'aneth vis-à-vis des 4 souches bactériennes testées.	166
Figure 76: Mortalité corrigée des adultes de <i>C. maculatus</i> par inhalation de l'huile essentielle en fonction du temps.	167
Figure 77: Détermination des TL ₅₀ et TL ₉₀ de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> par effet inhalation vis-à-vis de <i>C. maculatus</i> .	168
Figure 78: Mortalité corrigée des adultes de <i>C. maculatus</i> par effet contact en fonction des doses d'huile essentielle.	169
Figure 79: Détermination des DL ₅₀ et DL ₉₀ de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> par contact.	170
Figure 80: Nombre d'œufs pondus par femelle de <i>C. maculatus</i> traitée à l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i> en fonction de la concentration.	171
Figure 81: 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.	172
Figure 82: Variation du pourcentage moyen d'émergence de <i>C. maculatus</i> en fonction des doses de l'huile essentielle de lavande.	173
Figure 83: Concentrations pour 50% d'inhibition des radicaux libres du BHT et de l'extrait de <i>L. stoechas</i> .	179

Liste des tableaux

Tableau 1: Effet du substituant sur la couleur de l'anthocyanidine	32
Tableau 2: Teneurs en composés majoritaires des huiles essentielles de quelques espèces de lavande.	36
Tableau 3: Composés majoritaires des huiles essentielles de différentes sous-espèces de <i>L. stoechas</i> du Portugal et d'Espagne.	39
Tableau 4: Biosystématique de l'aneth (<i>Anethum graveolens</i> L.).....	42
Tableau 5: Caractères comparés des principales espèces du genre <i>Juniperus</i> (Debazac, 1991)	46
Tableau 6: Biosystématique du genévrier (<i>Juniperus phoenicea</i> L.)	47
Tableau 7: Ennemis naturels de <i>C. maculatus</i>	57
Tableau 8: Mécanisme d'oxydation des lipides	62
Tableau 9: Représentation des différences existant entre les huiles essentielles et antibiotiques.....	87
Tableau 10: Origine et date de récolte des échantillons de plantes étudiées.....	90
Tableau 11: Caractéristiques des souches microbiennes testées	92
Tableau 12: Conditions opératoires utilisées lors de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes	96
Tableau 13: Rendement des extractions des huiles essentielles des échantillons étudiés	118
Tableau 14: Rendement en huile essentielle extraite à partir des feuilles de quelques échantillons de <i>Juniperus phoenicea</i>	119
Tableau 15: Rendement de l'extraction de l'huile essentielle des fruits par hydrodistillation de quelques échantillons de <i>Juniperus phoenicea</i> exprimé en g/100 g de matière végétale.	120
Tableau 16: Rendement de l'extraction des huiles essentielles à partir des fruits de <i>Juniperus phoenicea</i> par HD et ESSAM exprimé en g/100g de matière végétale.	120
Tableau 17: Rendements d'extraction en HE d' <i>Anethum graveolens</i> (Radulescu et al., 2010).	124
Tableau 18: Rendement d'extraction à partir des feuilles et des fruits de deux échantillons de <i>Juniperus phoenicea</i> de Sétif.....	125
Tableau 19: Rendement en extrait sec de deux échantillons de <i>Lavandula stoechas</i>	125

Tableau 20: Rendements en % (v/100g de MV), en extrait éthanolique des graines d' <i>Anethum graveolens</i> dans cinq pays.	126
Tableau 21: Rendement des différents procédés d'extraction.	127
Tableau 22: Le rendement des différentes parties d' <i>Anethum graveolens</i>	127
Tableau 23: Teneur en polyphénols de deux échantillon de <i>Juniperus phoenicea</i>	128
Tableau 24: Comparaison de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait étudié avec celui obtenu par d'autres études.	129
Tableau 25: Comparaison entre les teneurs en polyphénols des extraits de trois espèces de lavande.	129
Tableau 26: Teneurs en flavonoïdes de deux échantillons de lavande.....	131
Tableau 27: Composition chimique de l'HE des feuilles de <i>J. phoenicea</i> de Sétif	132
Tableau 28: Comparaison entre les teneurs (%) des composés majoritaires des huiles essentielles extraites par hydrodistillation à partir des feuilles de <i>J. phoenicea</i>	135
Tableau 29: Composition chimique de l'huile essentielle extraite à partir des fruits de <i>Juniperus phoenicea</i> par HD et par ESSAM.	138
Tableau 30: Teneurs des principaux composés des huiles essentielles de <i>Juniperus phoenicea</i>	140
Tableau 31: Composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>L. stoechas</i>	141
Tableau 32: Teneurs en composés majoritaires de quelques échantillons de <i>L. stoechas</i>	148
Tableau 33: Composition chimique de l'HE extraite par hydrodistillation à partir du fruit d' <i>Anethum graveolens</i>	149
Tableau 34: Comparaison des teneurs de quelques composés des HE de l'espèce <i>Anethum graveolens</i>	153
Tableau 35: Comparaison de la composition chimique en constituants majoritaires de l'HE d' <i>Anethum graveolens</i> extraite à partir des feuilles, fleurs et du fruit (Radulescu et al., 2010) avec nos résultats	153
Tableau 36: Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de l'érigéron (<i>Conyza canadensis</i>)	154
Tableau 37: Sensibilité des souches étudiées aux HE de l'aneth (Diffusion en mm par disque ± Standard déviation)	160

Tableau 38: Sensibilité de quelques souches microbiennes vis-à-vis de l'HE d'aneth en fonction de la saison et de l'organe d'extraction (Vokk et al., 2011).....	161
Tableau 39: Evaluation des CMI de l'huile essentielle d'aneth	164
Tableau 40: Concentration Minimales Inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d'Aneth	165
Tableau 41: TL ₅₀ et TL ₉₀ de l'huile essentielle de lavande.	168
Tableau 42: DL ₅₀ et DL ₉₀ de l'huile essentielle et de lavande.	170
Tableau 43: Résultats du piégeage du radical DPPH par le BHT et les huiles essentielles de <i>Juniperus phoenicea</i> extraites des Fruits (Fr), des feuilles (Fe) et des fruits par hydrodistillation assistée par microondes (Fe MO)	175
Tableau 44: Résultats du test du pouvoir de piégeage du radical DPPH de l'extrait des feuilles de <i>Juniperus phoenicea</i> :	176
Tableau 45: Concentration pour 50% d'inhibition des radicaux libres pour l'extrait des feuilles de <i>Juniperus phoenicea</i> et pour le BHT.	177
Tableau 46: Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH du BHT et de l'huile essentielle de lavande.....	177
Tableau 47: Résultats du test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par le BHT et l'extrait de la lavande.....	178
Tableau 48: Activité de piégeage du radical DPPH par l'HE d'aneth et le BHT.....	180
Tableau 49: Concentration nécessaire pour inhiber 50% des radicaux libres par l'HE d' <i>Anethum graveolens</i> et le BHT.....	180
Tableau 50: Résultats du test du pouvoir réducteur du BHT et des huiles essentielles de <i>Juniperus phoenicea</i> extraites des Fruits (Fr), des feuilles (Fe) et des fruits par hydrodistillation assistée par microondes (Fe MO).	182
Tableau 51: Résultats du test du pouvoir réducteur de l'extrait des feuilles de <i>Juniperus phoenicea</i>	183
Tableau 52: Pouvoir réducteur du BHT et de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i>	184
Tableau 53: Pouvoir réducteur du BHT et de l'extrait de <i>L. stoechas</i>	184
Tableau 54: Pouvoir réducteur du BHT et de l'huile essentielle d'Aneth.....	185

Introduction générale

Introduction générale :

Les plantes aromatiques occupent une place importante dans notre vie de tous les jours, ainsi elles trouvent des utilisations dans plusieurs domaines: en agroalimentaire, parfumerie, cosmétique, médecine....ceci est due en grande partie à leurs contenances en substances biologiquement actives. Ces produits sont issus 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, hygiénique 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, 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 Bruchidae 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 sur 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.

L'emploi des huiles essentielles et des extraits de plantes comme agents antimicrobiens a largement prouvé leur grand spectre d'action (bactéries, champignons et les levures). A l'heure actuelle le recours aux huiles essentielles et aux extraits paraît comme une alternative pour la réduction des risques de développement d'antibiorésistance liée à l'émergence des microorganismes pathogènes mutants. L'usage généralisé et abusif des antibiotiques en thérapeutique humaine et animale conduit de plus en plus à la sélection de germes résistants, qui paradoxalement ont plus de mal à développer des résistances aux mélanges complexes de composés que représentent les huiles essentielles et les extraits.

Le présent travail vise à valoriser quatre plantes appartenant à différentes familles botanique, poussant en Algérie à l'état spontané 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 *Conyza canadensis*, *Lavandula stoecha*, *Foeniculum vulgare* et *Juniperus phoenicea*.

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

- 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

- La quatrième partie consistera en une évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles étudiées sur 5 souches de micro-organismes causant la détérioration de la qualité des produits alimentaires.

I. Synthèse bibliographique

- ***Chapitre 1 : Les huiles essentielles ;***
- ***Chapitre 2 : Les composés phénoliques ;***
- ***Chapitre 3 : Monographie des espèces étudiées ;***
- ***Chapitre 4 : Oxydation et antioxydants***
- ***Chapitre 5 : Activité antimicrobienne***

Chapitre I : 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 destillatione**" 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.

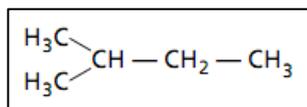


Figure 3: Structure de l'isopentane (**Taiz et Zeiger, 2002**)

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.

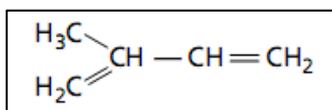


Figure 4: Structure de l'isoprène (**Taiz et Zeiger, 2002**).

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**, $(\text{C}_5)_n$ 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 clef de cette voie de biosynthèse. Il subit ensuite des réactions de pyrophosphorylation, décarboxylation et de déshydratation pour aboutir à l'**isopentenyl diphosphate (IPP)**.

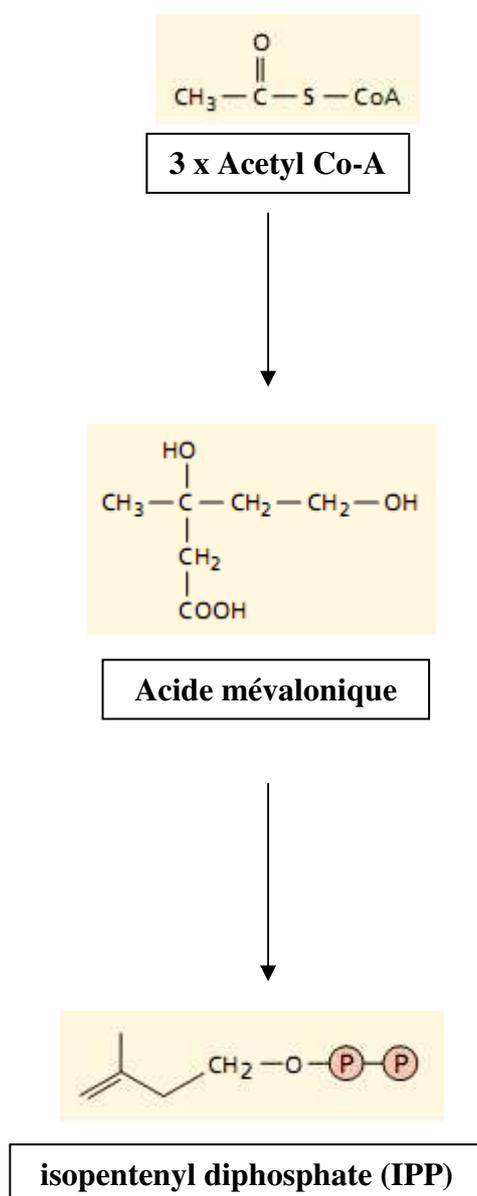


Figure 3: Schéma de la voie de l'acide mévalonique (Taiz et Zeiger, 2002).

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 4 illustre les étapes de la voie du DMAPP.

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 5.

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**).

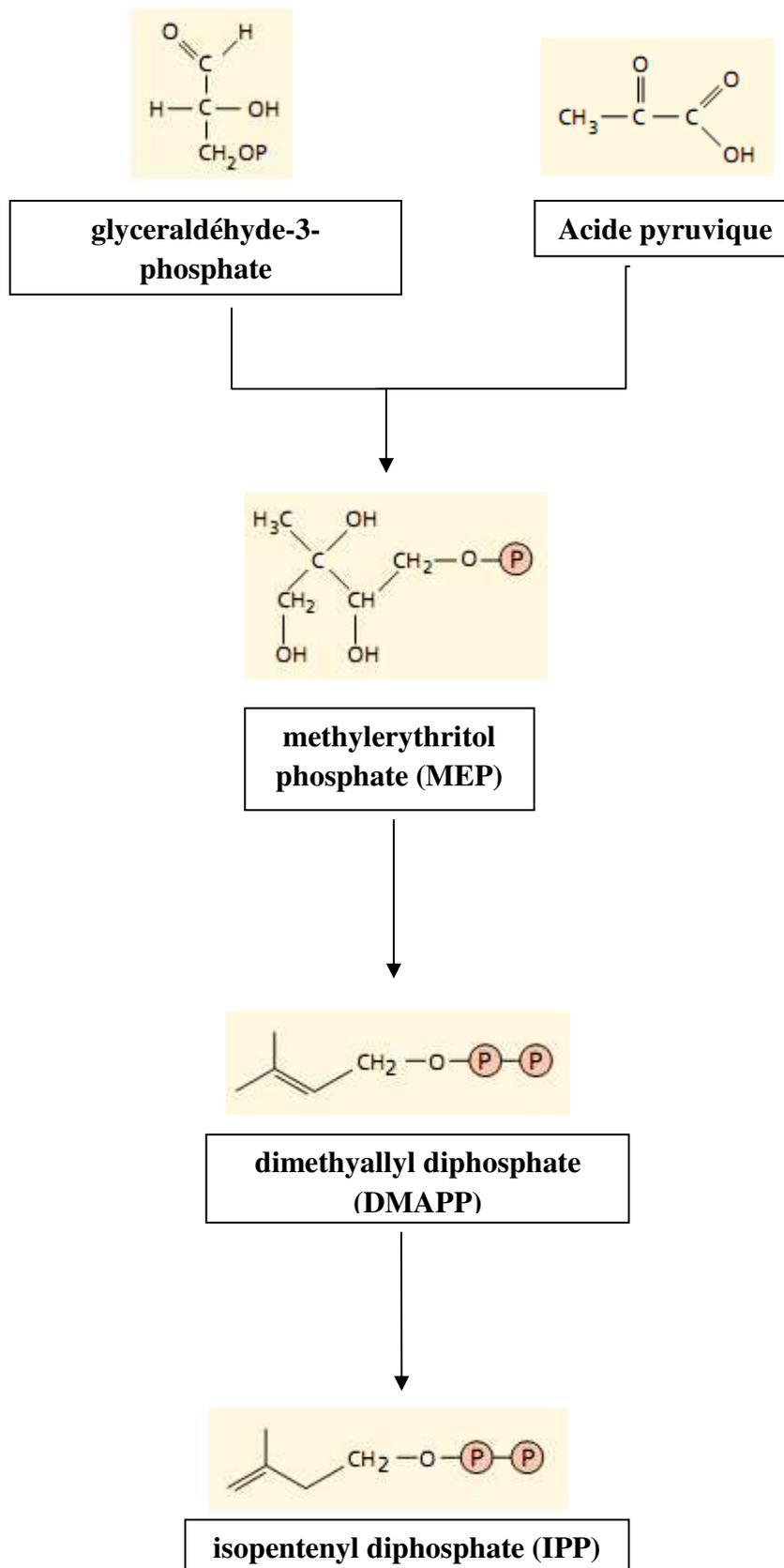


Figure 4: Schéma de la voie du DMAPP (Taiz et Zeiger, 2002).

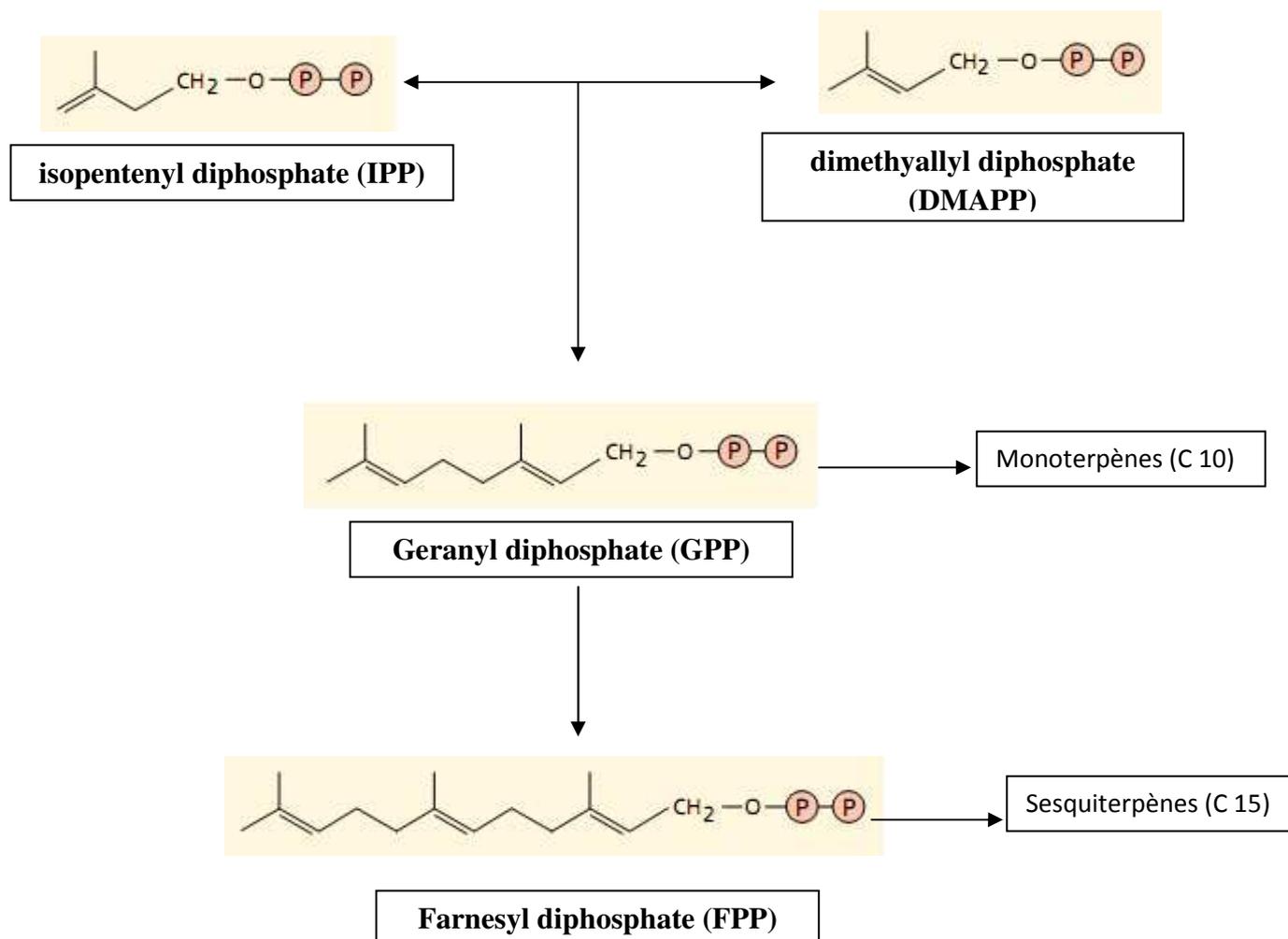


Figure 5: Biosynthèse des composés terpéniques (Taiz et Zeiger, 2002).

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 cellulosiques. 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. L'utilisation des ultrasons pendant l'hydrodistillation est

vaine. Une unité d'hydrodistillation équipée d'une fontaine d'ultrasons peut produire plus vite des points d'ébullition, mais ne dégonflent pas les bulles. Par conséquent, les ultrasons ne sont pas une bonne option pour les procédés par ébullition.

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 CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 : (Crouzet, 1998 ; Cicile, 1994, 2002 ; Pibiri, 2005).

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

▪ 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.

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 (ρ -cymène, α -terpinène), ou bicycliques (camphène, pinène). A côté des hydrocarbures, on rencontre des dérivés oxygénés divers : des aldéhydes (linalal, gèranial..), alcools (citronellol, gèraniol..) et acides (acide linalique..) voire des esters (acétate de linalyle...) (**Singh et al., 1989, Kaufman et al., 1999**).

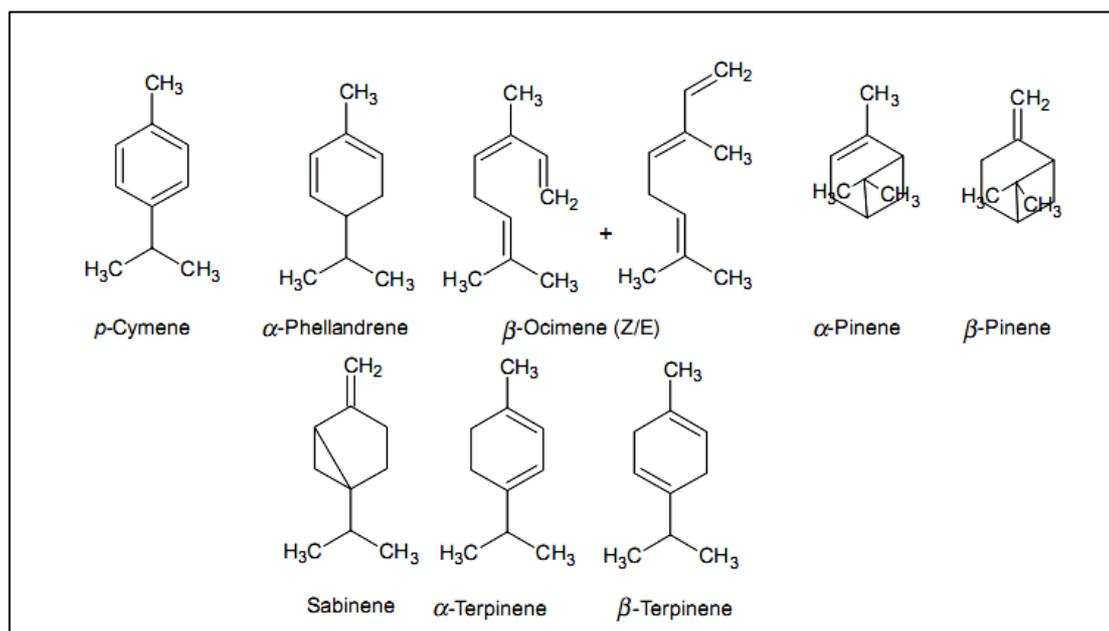


Figure 6: Structure de quelques monoterpènes

▪ **Sesquiterpènes :**

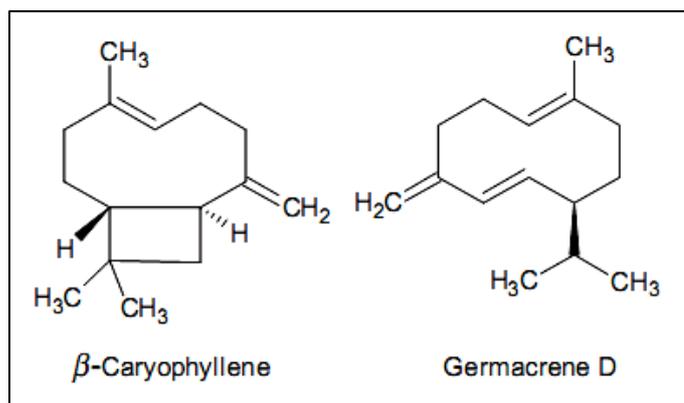


Figure 7: Exemples de sesquiterpènes entrant dans la composition chimique des huiles essentielles

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 (β -bisabolène longifolène..), alcools (carotol, farnesol...) aldéhydes (sinensal..) et d'esters (acétate de cedryle

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.

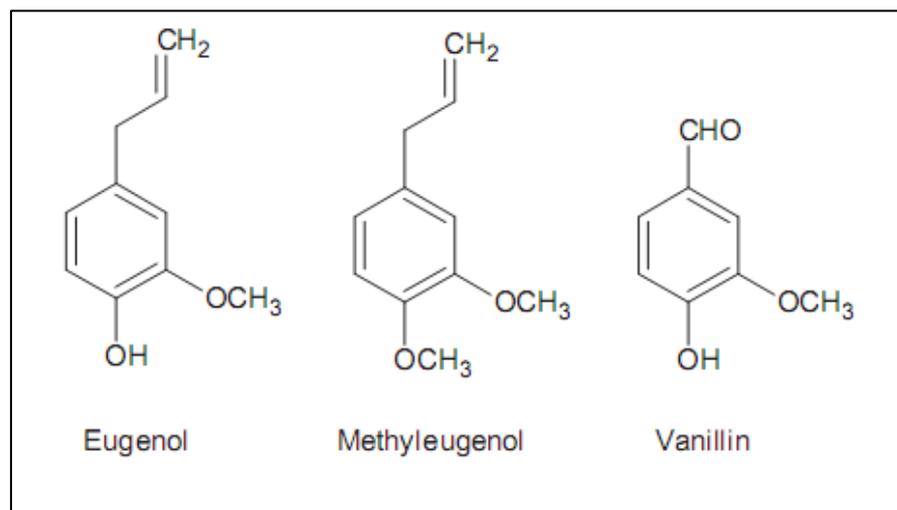


Figure 8: Structure de quelques dérivés du phénylpropanoïde.

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_3 à C_{10}), 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. Des huiles essentielles peuvent donc ne pas être recommandées pour l'usage dans la conservation des aliments. 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 (Conner, 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.

L'acide *trans*-cinnamique, l'acide *p*-coumarique, et leurs dérivés sont des composés phénoliques simples appelés les phénylpropanoïdes parce qu'ils contiennent un noyau benzène et une chaîne latérale de trois carbones. Les phénylpropanoïdes sont des éléments importants pour la formation des composés phénoliques plus complexes.

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).

La figure 9 illustre les différentes voies de biosynthèse des composés phénoliques.

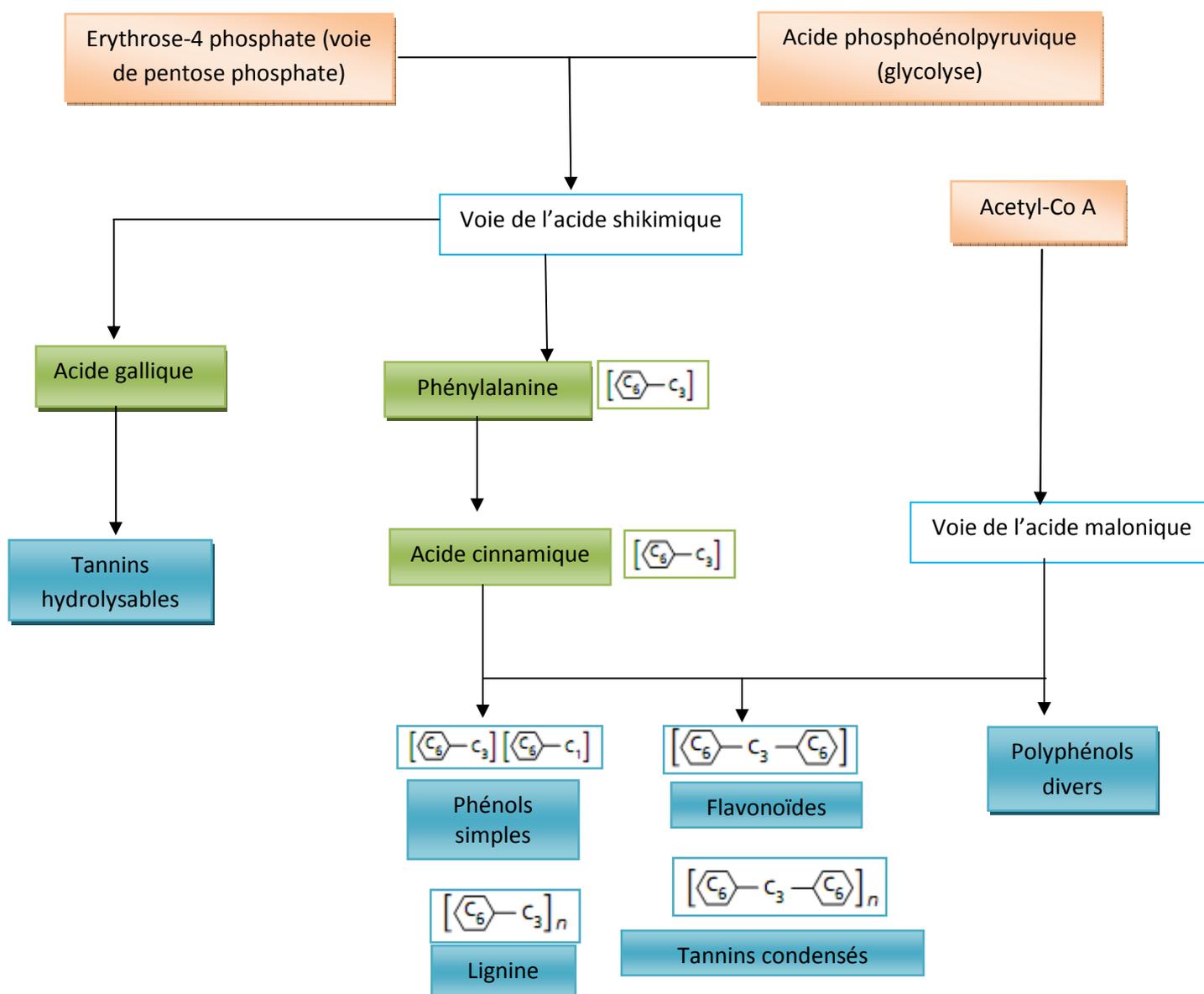


Figure 9: Schéma général des principales voies de biosynthèse des composés phénoliques (Taiz et Zeiger, 2002).

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 10).

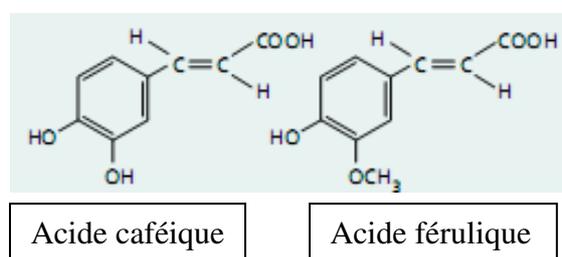
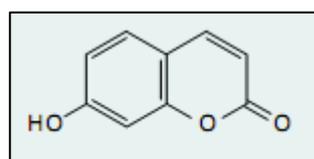
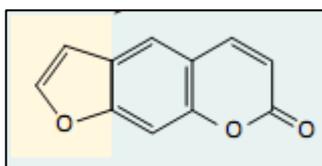


Figure 10 : Exemples de phénylpropanoïdes simples (Taiz et Zeiger, 2002).

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 11 : Exemples de coumarines (Taiz et Zeiger, 2002).

2.1.3. Les dérivés de l'acide benzoïque : Ils possèdent un squelette de type C_6-C_1 qui est formé par le clivage d'un fragment de deux carbones du côté de la chaîne aliphatique.

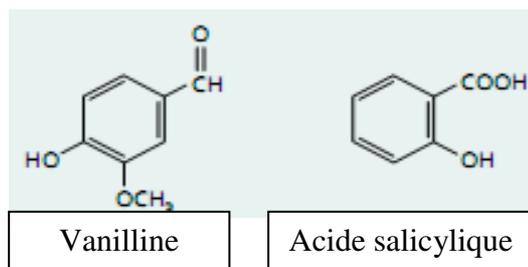


Figure 12: Exemples de dérivés de l'acide benzoïque (Taiz et Zeiger, 2002).

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**).

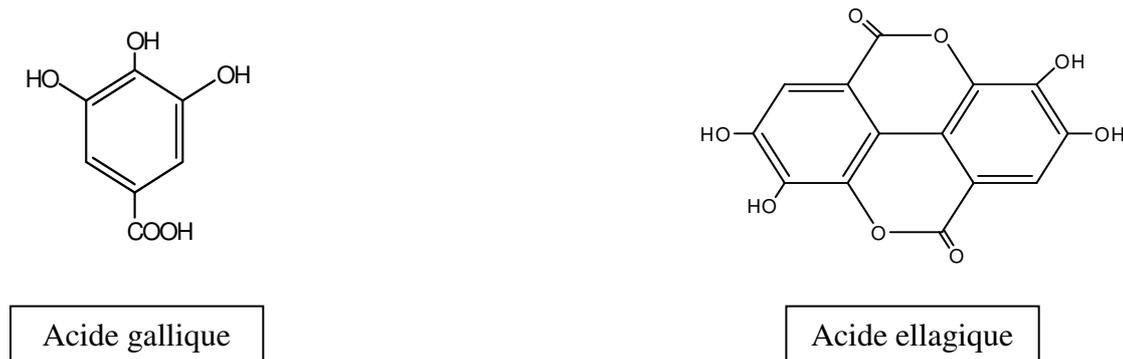


Figure 13: Structures de l'acide gallique et de l'acide ellagique

➤ **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 asymétriques C2 et C3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. La structure des tannins condensés est illustrée sur la figure 14.

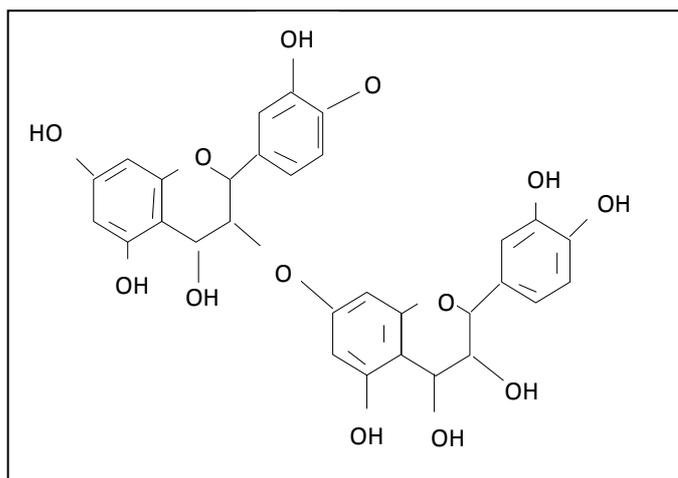


Figure 14: Structure de base des tannins condensés (Bruneton, 1987).

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 15). 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. 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 la 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.

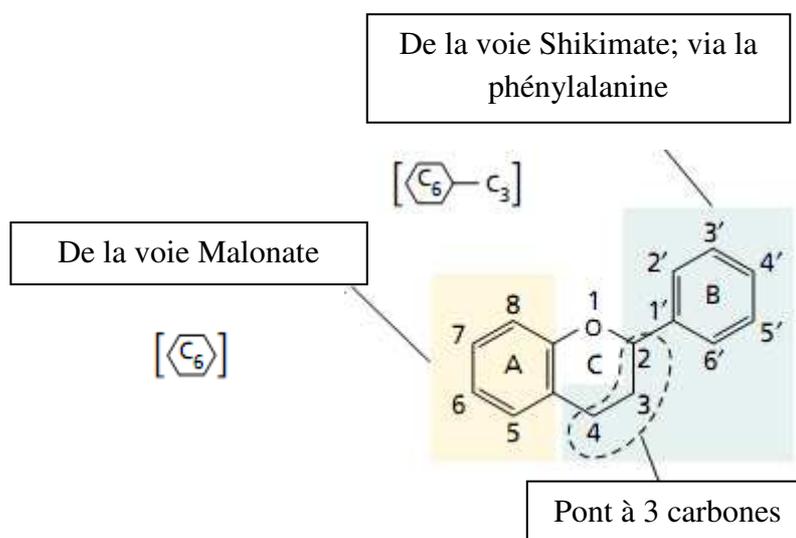


Figure 15: Structure du squelette de base des flavonoïdes.

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

Anthocyanidine	Substituants	Couleur
Pelargonidine	4'-OH	Orange, rouge
Cyanidine	3'-OH et 4'-OH	Rouge violacé
Delphinidine	3'-OH et 4'-OH et 5'-OH	Pourpre bleuâtre
Peonidine	3'-OCH ₃ et 4'-OH	Rouge violacé
Petunidine	3'-OCH ₃ et 4'-OH et 5'-OCH ₃	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).

➤ ***Chapitre 3 : 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 préparés 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
Camphor (%)	0-0,2	12	5,3-14,3
α - et β -pinène (%)	0,02-0,3	0,6-0,9	1,6-3,6
Borneol (%)	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
Farnesene (%)	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, camphor, 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, camphor, α et β -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** : *Lanvandula*
- **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 (silicicoles, calcifuge). L'inflorescence de *Lavandula stoechas* est illustrée par la figure16.



Figure 16: *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, α -pinène, β -pinène, β -santalène, bornéol, camphor, 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		
	Camphor	1,8-Cinéol	Fenchone
<i>ssp. stoechas</i>	23	-	42
<i>ssp. pedunculata</i>	24	-	20
<i>ssp. sampaioana</i>	38	-	20
<i>ssp. luisieri</i>	-	22	-

Source : Garcia et al. (1989).

D'après le tableau 3, le camphor 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, tranquilisant, 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. L'aneth (*Anethum graveolens*)

2.1. Généralités:

Le fenouil, une plante de la famille des Apiacées (ou Umbellifères), aromatique et médicinale aux feuilles vertes foncées et aux fleurs bleuâtres, est douée d'excellentes propriétés carminatives, et est utilisée comme remède depuis l'Antiquité. Elle est cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles et ses graines très aromatiques, et se rapproche du fenouil par son odeur et ses propriétés, d'où ses noms de fenouil bâtard ou faux anis. Le nectar de ses fleurs est très apprécié des abeilles.

2.2. Histoire et tradition

Originnaire du bassin méditerranéen (*Anethum graveolens*) ou d'Asie centrale (*Anethum sowa*), elle était utilisée :

- Par les Égyptiens il y plus de 5000 ans, en tant que plante médicinale ; dans une ancienne recette égyptienne, mentionnée dans le *Papyrus Ebers*, on recommande l'aneth, associé à d'autres ingrédients, pour faire un mélange employé contre la douleur.
- Par les Grecs et les Romains pour son parfum, pour la cuisine, et pour ses vertus médicinales ; Les Grecs recouvraient leurs yeux avec des feuilles

d'aneth pour s'endormir plus vite. Au Moyen Age, l'aneth éloignait le mauvais sort.

- par les peuples Israélites en tant que plante potagère. (**Larousse des plantes médicinales, 2001**).

2.3. Caractéristiques botanique

2.3.1. Description de la plante

Plante herbacée annuelle, érigée pouvant atteindre 1,5 m de haut. La plante est glabre, vert foncé et légèrement striée de bleu au niveau supérieur, la racine est pivotante, longue et fine. Les tiges sont grêles, rondes et creuses, lisses, finement striées de bandes blanches et vertes. Les feuilles sont alternes, de couleur bleu-vert ; les feuilles basales sont pétiolées, di- ou tripennatiséquées et se terminent en lanières filiformes ; elles portent une gaine courte, bordée de blanc ; seules les feuilles supérieures sont sessiles.

L'inflorescence est formée d'ombelles composées et plates pouvant atteindre jusqu'à 20 cm de diamètre. Les fleurs sont de très petite taille, radiale*, chacune composée de 5 sépales à limbe non développé, de 5 pétales jaune à pointe recourbée vers l'intérieur, de 5 étamines saillantes, de 2 styles courts, d'un ovaire infère et bicarpellaire. Le fruit est un diakène comprimé au niveau de la face dorsale. À maturité les deux méricarpes se détachent l'un de l'autre (**Filliat, 2012**). La figure 4 illustre les fleurs et les graines d'aneth.



Figure 17: *Anethum graveolens* L.

2.3.2. Classification botanique

- **Nom scientifique :** *Anethum graveolens* L. syn *Peucedanum graveolens*.
- **Nom commun :** Aneth, Fenouil batârd, Fenouil puant (Français), bessbes ou habate hlawa (Bérbere), Al chabbte (Arabe).

Tableau 4 : Biosystématique de l'aneth (*Anethum graveolens* L.)

Niveau de systématique	
Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Apiales
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	<i>Anethum</i>
Espèce	<i>Anethum graveolens</i> L.

2.3.3. Habitat

L'aneth est originaire de l'Europe du Sud, de l'Asie centrale et méridionale. A l'état sauvage, il pousse sur les friches. On le cultive notamment en Europe et en Amérique du Nord. (**Larousse des plantes médicinales, 2001**).

2.4. Composition chimique:

2.4.1. Huile essentielle du fenouil commun

Les graines du fenouil contiennent jusqu'à 5% d'huile essentielle (carvone et limonène), des flavonoïdes, des coumarines, des xanthones et des triterpènes. (**Larousse des plantes médicinales, 2001**).

2.4.2. Les principaux constituants biochimiques de l'huile essentielle du fenouil

- Chromatographie phase gaz du lot NHE0086 :

Monoterpénones: carvone (44.39%), (E)-dihydrocarvone (0.74%), (Z) dihydrocarvone (2.84%).

Monoterpènes: limonène (49.70%), α -phellandrène (0.34%), p-cymène (0.15%), α -terpinène (0.70%).

- Chromatographie phase gaz du lot NHE0266 :

Monoterpénones: carvone (44.91%), (E)-dihydrocarvone (0.76%), (Z)-dihydrocarvone (2.97%).

Monoterpènes: limonène (49.34%), α -phellandrène (0.45%), para-cymène (0.14%).

3.1.2. Les propriétés de l'huile essentielles d'aneth

- Anticatarrhale, mucolytique, décongestionne les poumons ;
- Cholagogue, cholérétique : stimule les fonctions du foie et du pancréas ;
- Eueptique : facilite la digestion et l'élimination des gaz ;
- Diurétique ;
- Anti-inflammatoire rénale ;
- Antispasmodique ;
- Favorise les règles ;
- Action anticoagulante modérée.

2.5. Principales utilisations

➤ **Usage culinaire**

C'est une épice très utilisée en Allemagne, en Hongrie, en Pologne, en Russie, en Roumanie, en Scandinavie, mais aussi en Inde, et dans de nombreux autres pays du monde.

- les feuilles, fraîches ou séchées, sont employées pour aromatiser différentes préparations culinaires, notamment les salades, les poissons, les viandes et les sauces.
- les graines servent pour parfumer liqueurs et confitures.

➤ **Usage thérapeutique**

Ses propriétés sont aussi stomachique, digestive, apéritive, carminative, antispasmodique, diurétique, anti-inflammatoire, galactagogue (lactation), calmante et préparant au sommeil.

- Utilisé en infusion, l'aneth constitue un excellent stimulant du système digestif.
- Ses graines, en infusion, permettent d'arrêter le hoquet, mal de tête, toux des enfants.
- Autres indications : dyspepsie, vomissements d'origine nerveuse, flatulences, insuffisance hépatobiliaire, aide la lactation, gaz intestinaux, météorisme abdominal, borborygme, spasmes, crampes et en tant qu'antiseptique intestinal.

Dans l'histoire, il fut aussi utilisé pour l'épilepsie, et pour favoriser le lait des nourrices (chez les Grecs anciens), pour calmer les convives ayant trop bu dans les banquets (Charlemagne), pour ses vertus aphrodisiaques et contre les mauvais sorts (sorcières et mages du Moyen Âge), pour favoriser les capacités du cerveau (XVII^e siècle)

2.6. Toxicologie

L'huile essentielle d'aneth *per os* peut entraîner une dépression du système nerveux central à type d'hypnotique faible et anticonvulsivant due à sa concentration en carvone et limonène. L'aneth contient des furanocoumarines qui sont des agents

photosensibilisants pouvant entraîner une phototoxicité après exposition solaire (Filliat, 2012). L'huile essentielle d'aneth bienfaisante en temps ordinaire peut s'avérer, en période de grossesse, toxique voire dangereuse pour l'enfant à venir. Les femmes enceintes doivent donc utiliser les huiles essentielles avec beaucoup de prudence et de circonspection

3. L'érigéron :

3.1. Historique

Cette plante comme son nom l'indique est originaire du Canada, l'est de l'Amérique du Nord (USA et Canada), La vergerette fut introduite sur le vieux continent au 18^{ème} siècle où elle a pris une extension spécialement dans tous les sites incultes. Elle a fait son apparition en Europe au siècle dernier, apportée dans doute avec les ballots de quelques marchandises en provenance d'Amérique. L'implantation en Europe a pris les traits d'une naturalisation, elle s'est reproduite régulièrement. Depuis elle s'est répandue partout à travers l'Europe.

3.2. Caractéristique botanique

L'érigéron du Canada est une plante annuelle peu velue atteignant 1 m de haut, à tige dressée et dichotome. Feuilles alternes, lancéolées et rétrécie à la base en une sorte de pétiole entièrement ou légèrement dentée. Fleurs ligulée dépassant à peine les tubuleuses, bractée linéaire subglabre. Les fleurons centraux sont bisexués, alors que les fleurs périphériques ligulées sont seulement femelles. La floraison de l'érigéron se poursuit durant tout l'été (juin-octobre) où elle se couronne d'une panicule allongée qui se transforme rapidement en touffe blanche.

4. Genévrier de Phénicie:

Le terme latin *juniperus*, est étymologiquement peu clair. Une hypothèse le ferait venir du celte *gen* « buisson », et *prus* « âcre ». Selon une autre hypothèse le nom se composerait des mots latins '*junior*' « plus jeune » et '*parere*' « apparaître » en référence au fait que deux générations de baies existent en même temps (les plus jeunes apparaissent avant que les baies mûres tombent).

Le genévrier est une plante protectrice qui selon la tradition chrétienne, il cacha la Vierge et l'enfant Jésus des soldats de l'Hérode. Avec ses branches piquantes il repousse les troupeaux au pâturage, l'odeur de ses baies détourne les chiens sauvages et protège les petits animaux de la forêt tels que les lièvres et les oiseaux (Teuscher et al., 2005).

Tableau 5: Caractères comparés des principales espèces du genre *Juniperus* (Debazac, 1991)

Espèce	Feuilles	Fruits	Port
<i>Juniperus communis</i>	Toutes aciculaires, une bandelette blanchâtre à la face supérieure.	Ovoïde. 4-8mm ; vert glauque la 1 ^{ère} année puis bleu noirâtre à maturité	Variable : fastigié ou étalé
<i>Juniperus oxycedrus</i>	Toutes aciculaires, deux bandelettes blanchâtres à la face supérieure.	Globuleux. 6-10 mm vert pruineux la 1 ^{ère} année ; brun luisant à maturité.	Etalé
<i>Juniperus phoenicea</i>	Feuilles adultes squamiformes.	Globuleux 5-15 mm ; brun à maturité	Dressé, cime dense
<i>Juniperus thurifera</i>	Feuilles adultes squamiformes.	Subglobuleux 7-12 mm bleu noirâtre à maturité	Port dressé, fastigié
<i>Juniperus sabina</i>	Feuilles adultes squamiformes.	Ovoïde 5-8 mm vert pruineux la 1 ^{ère} année puis bleu noirâtre à maturité	Port couché.

- **Genévrier de Phénicie :** *Juniperus phoenicea* L. 1753

4.1. Généralités :

La signification exacte du mot latin *phoenicea* est *pourpre*, l'espèce *Juniperus phoenicea* doit son nom à la couleur rouge de ses baies et pas à son province d'origine ; donc l'espèce aurait du s'appeler **genévrier rouge**.

Juniperus phoenicea (genévrier de Phénicie, "Araar") est une plante appartenant à la famille des cupressacées. C'est un arbre branchu pouvant atteindre 8 mètres de hauteur, possédant un tronc court qui peut atteindre 2 mètres de circonférence.

Cette espèce est monoïque, la floraison a lieu pendant l'hiver et la fructification à la fin de l'été de l'année suivante. A maturité, les fruits sont bruns-rouges et luisants. Elle devient de plus en plus rare sous l'effet de son exploitation abusive (son bois est très recherché comme combustible et fournit un charbon très apprécié) (Le Floc'k, 1983).

4.2. Classification :

- Nom scientifique: *Juniperus phoenicea* L., 1753
- Noms communs: genévrier de Phénicie, genévrier rouge, Cèdre de Lycie
genévrier de Lycie (Français) ; Phoenician juniper (Anglais) ; Araar (Arabe).

Tableau 6 : Biosystématique du genévrier (*Juniperus phoenicea* L.)

Niveau de systématique	
Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales
Famille	Cupressaceae
Genre	Juniperus
Espèce	<i>Juniperus phoenicea</i> L., 1753

4.3. Caractères morphologiques:

Arbre de troisième grandeur, ne dépassant pas 8 mètres de hauteur et 2 mètres de circonférence, aux branches touffues disposées en gobelet en partant de la base du tronc. Les feuilles très petites sont étroitement appliquées sur le rameau comme celle du Cyprès. Il fructifie assez abondamment et de bonne heure ; son fruit qui a l'aspect d'une baie charnue rouge brun de 8-15 mm, renferme des graines à enveloppe très dure mettant parfois plusieurs années à germer (**Boudy, 1952**).

Une vue générale d'un rameau de *Juniperus phoenicea* portant des feuilles et des fruits (baies) est illustrée par figure 18 :



Figure 18: *Juniperus phoenicea* L. 1753

4.4. Aire botanique :

C'est une espèce méditerranéenne que l'on trouve en France (littoral méditerranéen et Alpes), dans les trois pays de l'Afrique du Nord, en Cyrénaïque.

En Afrique du Nord il couvre 450.000 hectares dont 290.000 en Algérie.

Le genévrier de Phénicie recule de plus en plus dans l'Atlas Saharien et sur le versant du sud du Grand-Atlas sous l'action du climat désertique ; mais surtout sous celle de l'homme et des troupeaux (**Boudy, 1952**).

4.5. Répartition en Algérie :

On le rencontre sur le versant saharien du Haut-Atlas et sur le Jbel Sarhro où il recule sous l'action conjuguée de l'homme et du climat. En dépit de sa taille réduite (il dépasse rarement huit mètres), le genévrier de Phénicie joue un rôle important quoique méconnu dans l'économie montagnarde: grand pourvoyeur de bois de feu, de perches de construction, de bois de service; parfois même de fourrage foliaire... Les perchettes de genévrier assemblées en couches tressées forment l'armature des terrasses de terre dans bien des maisons berbères (**Boudy, 1952**).

4.6. Ecologie :

Le genévrier de Phénicie est essentiellement xérophile, mais non thermophile comme Thuya. De toutes les essences forestières c'est elle qui résiste le mieux à l'aridité (dunes, montagnes du sud). Il est d'une rusticité et d'une vigueur

physiologique remarquables. En altitude sa limite inférieure est le littoral, et sa limite supérieure est de 2.400 m. Sa distribution est sous la domination du facteur climatique. Il se contente en montagne sèche de 250 mm d'eau. Il est indifférent à la nature du sol et pousse aussi bien sur les sables des dunes que sur les terrains calcaires les plus secs. Sa régénération s'effectue partiellement par rejet mais surtout par semis naturels. Les graines germent difficilement et restent longtemps dans le sol ; pour assurer la régénération par semis, il faudra donc une longue période, 20 à 25 ans au moins (**Boudy, 1952**).

4.7. Composition chimique de *Juniperus phoenicea* :

➤ Huile essentielle des feuilles :

- *Description* : Un liquide jaune pâle et de couleur de paille avec un goût piquant et une odeur légèrement désagréable.
- *Composants* : α -pinène, limonène, caryophyllène, p-cymène, pinocarveol, cineol, pinocarvone, myrtenol, myrtenal, bornéol, camphre (**Proenca da Cunha et al., 1977**).
- *Indice de réfraction* : 1.471-1.473 (**20°C**)
- *Densité relative à 20°C* (d_{20}^{20}) : 0.868-0.882 (**25/25°C**)
- Pour éviter toute confusion de cette huile avec celle de *Juniperus sabina* L., qui ne devrait pas être employée comme parfum l'ingrédient, (**IFRA, 1982**) a édité une directive recommandant les spécifications suivantes pour les huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* L. 1753
- *Indice d'acide*: 0.4-1
- *Indice d'ester*: 2.5-7
- *Densité relative à 20°C* (d_{20}^{20}): 0.864--0.873
- *Solubilité V/V à 20°C* : 0.5-6 dans l'alcool 96%.

➤ Extrait des feuilles :

- *Hydroxycoumrines* : ombelliférone
- *Flavonoïdes* : rutine, quercitrin, isoquercitrin,
- *Proanthocyanidines* : catéchine, épicatechine, gallocatéchine

4.8. Toxicité de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* : (Cairnes, 1980).

- **Toxicité aiguë** : La DL₅₀ oral chez les rats et les lapins a excédé 5g/Kg.
- **Phototoxicité** : Aucun effet phototoxicité n'a été produit quand le matériel non dilué a été appliqué à la peau des souris chauves ou des porcs.
- **Cytotoxicité** : Un extrait d'éthanol des brindilles et des feuilles de *J. phoenicea* L. est avéré cytotoxique dedans le système de culture de cellules de KB.

4.9. Utilisations :

Cette espèce est très utilisée en médecine traditionnelle, les feuilles sont utilisées sous forme de décoction pour soigner le diabète, diarrhée et rhumatisme alors que les fruits séchés et réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès (Le Flock, 1983). Une infusion ainsi que l'huile essentielle sont diurétique après administration à fortes doses chez l'animal, cette activité diurétique a été également démontrée chez l'homme. D'autres activités ont également été démontrées pour un extrait sec en suspension aqueuse, notamment des effets anti-inflammatoire et anti-œdémateux (Teuscher et al., 2005).

5. 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.

5.1. 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 tarsi (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**).

5.2. Systématique :

Embranchement : Arthropoda

Classe : Insecta

Ordre : Coleoptera

Sous-ordre : Phytophaga

Superfamille : Phytophagoidea

Famille : Bruchidae

Genre : *Callosobruchus*

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

5.3. 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**).

5.4. 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 tâches 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^{ème} 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 tâches noires rouges plus ou moins brunâtres (**Lepesme, 1944**).

5.5. 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**).

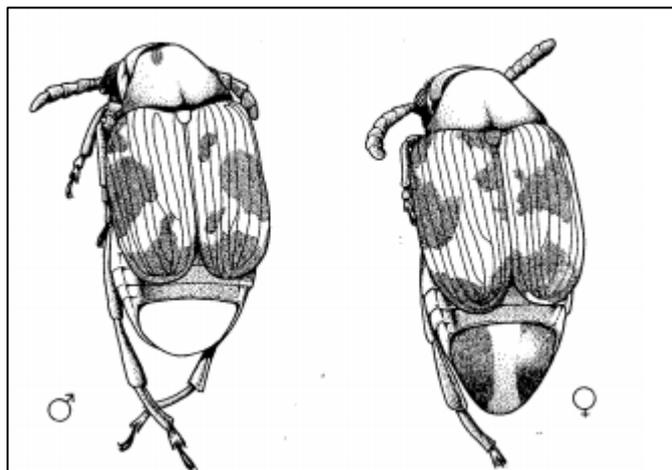


Figure 19: Schéma d'une vue dorsale du mâle et de femelle de *C. maculatus* (Brown et Downhower, 1988).

5.6. Cycle biologique:

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).

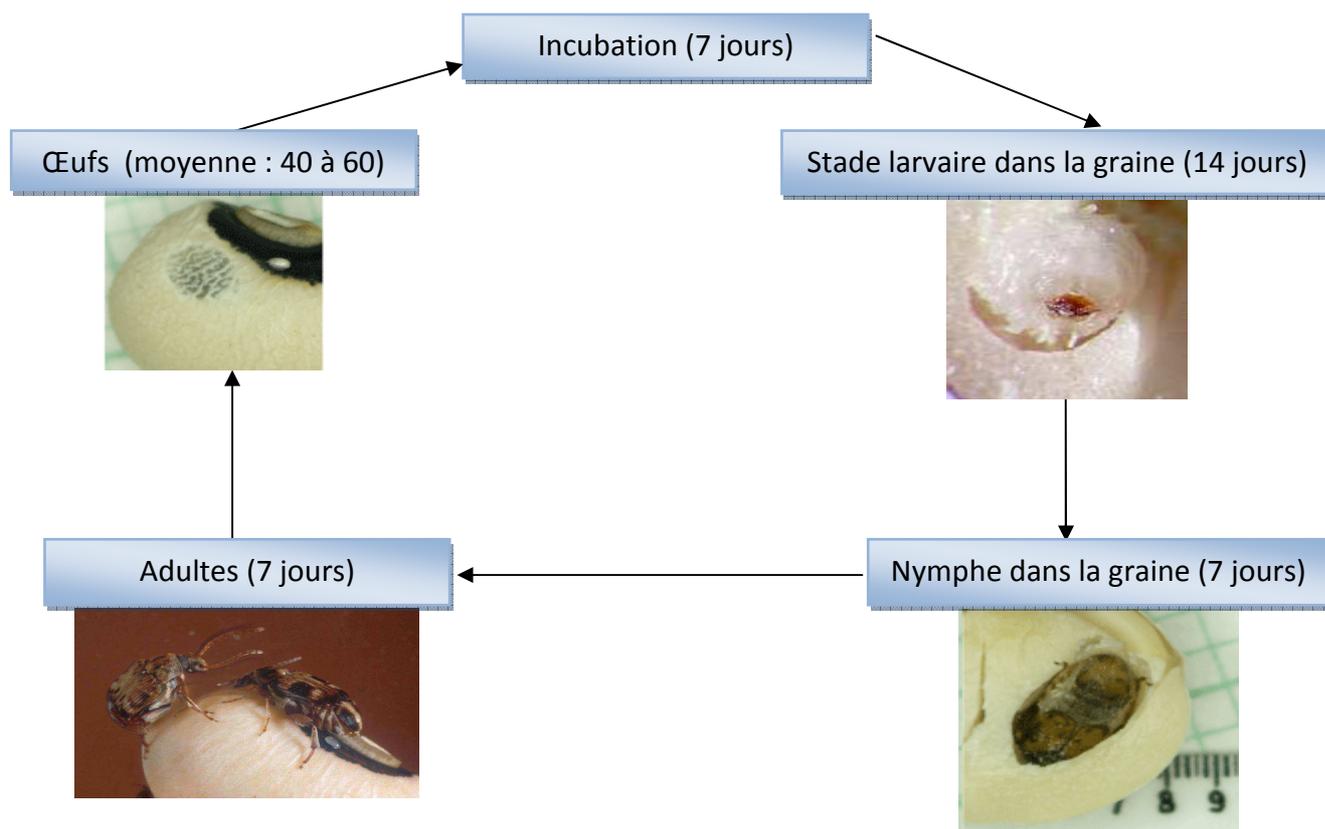


Figure 20: Cycle biologique de *C. maculatus* en conditions optimales
(Laurie et Ntoukma, 2002).

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.

5.7. 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**)

5.8. 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 7 regroupe quelques ennemis naturels de *C. maculatus*:

Tableau 7: Ennemies naturels de *C. maculatus*.

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

5.9. 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.

5.9.1. 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 $0,01\mu\text{g/adulte}$.

- **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).

5.9.2. 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_2) ou par le gaz carbonique (CO_2) fait chuter la teneur en oxygène et ainsi l'asphyxie de l'insecte.

5.9.3. 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).

5.9.4. Phytopesticides:

L'utilisation des produits chimique 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 vue 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.

5.10. 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**).

5.10.1. 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.

5.10.2. Sur le système nerveux :

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

5.10.3. 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 affectés 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 lépidoptères (*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 (Bachrouh *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 8 résume les principaux mécanismes d'oxydation des lipides.

Tableau 8: Mécanisme d'oxydation des lipides.

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 polyinsaturés	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 21: 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 22:

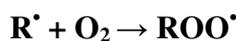


Figure 22: Phase de propagation

• 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 23 résume les principales voies de formation des produits secondaires d'oxydation des lipides.

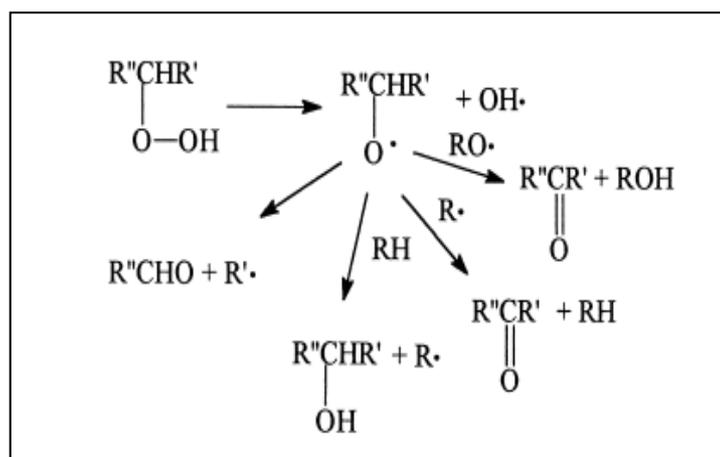


Figure 23: Formation des produits secondaires par la décomposition des hydroperoxydes (**Pokorny et al., 2000**).

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:

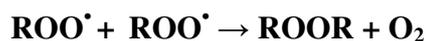


Figure 24: Phase de terminaison

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

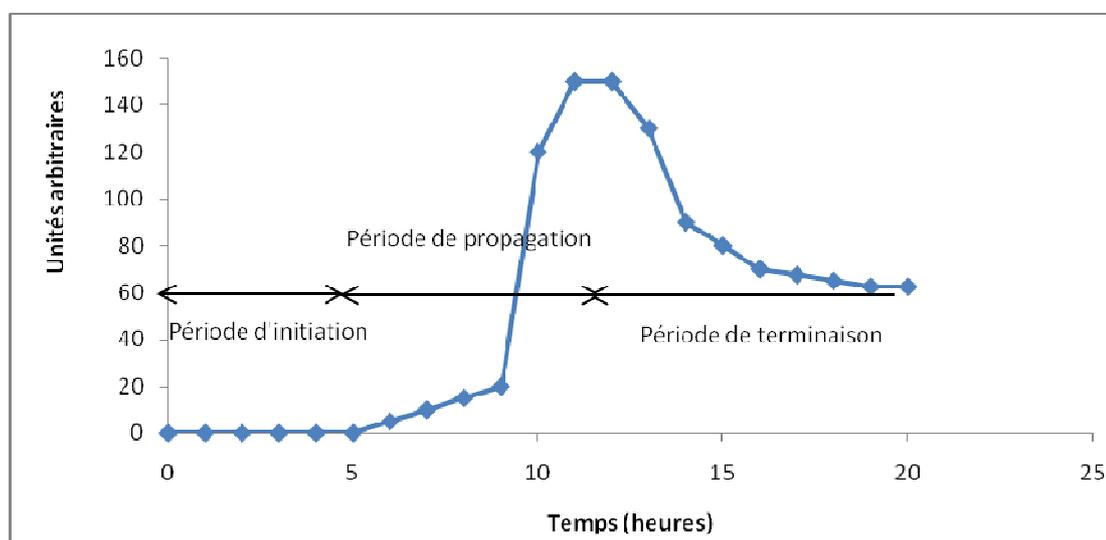


Figure 25: Représentation schématique de l'oxydation des acides gras insaturés par l'oxygène atmosphérique (la formation des produits d'oxydation est indiquée par des unités arbitraires en fonction du temps) (Pokorny et al., 2003).

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 26 :

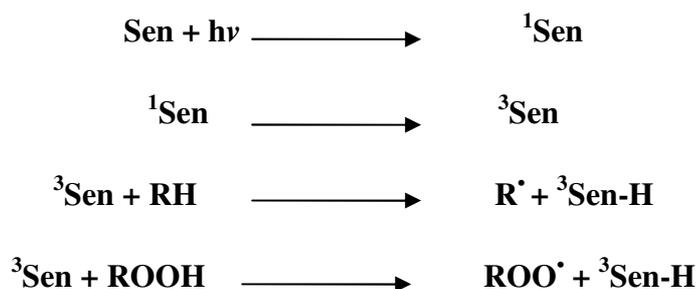


Figure 26: Photo-oxydation type 1

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 27 :

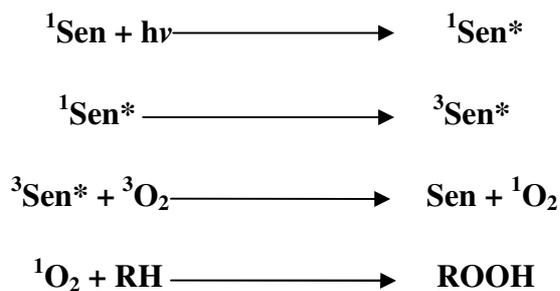


Figure 27: Photo-oxydation type 2

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° 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 tocopheroxyl / α -tocopherol. 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 10¹⁰ 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 28:

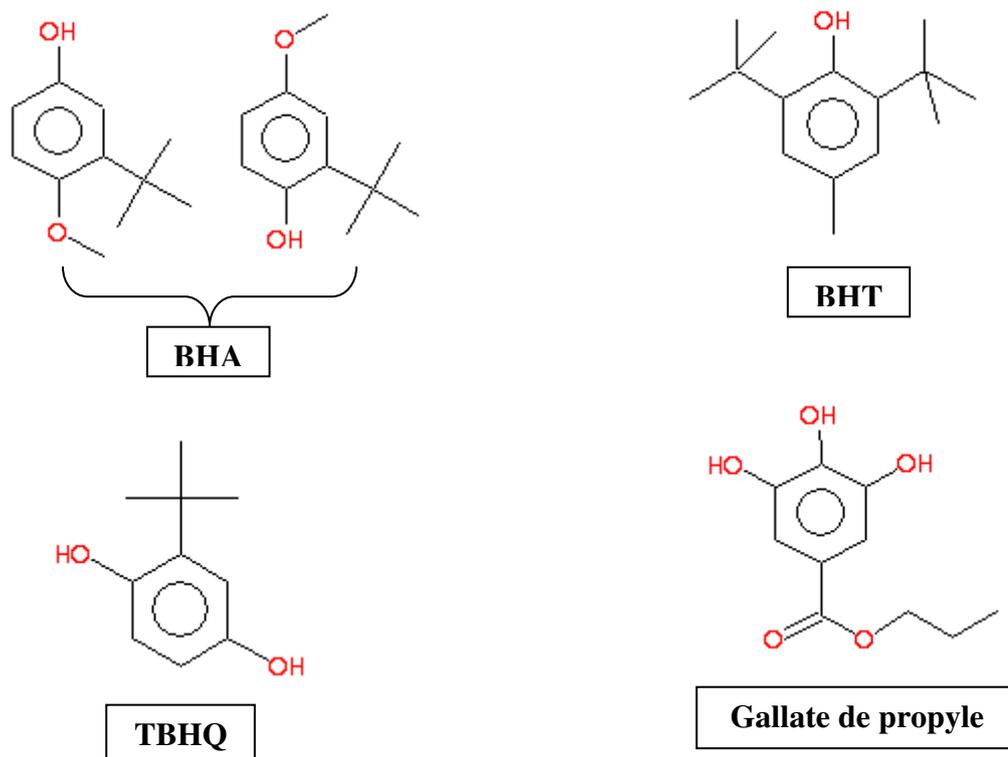


Figure 28: Structure de quelques antioxydants de synthèse

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 lipoxigénase 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 29 montre la structure des tocophérols.

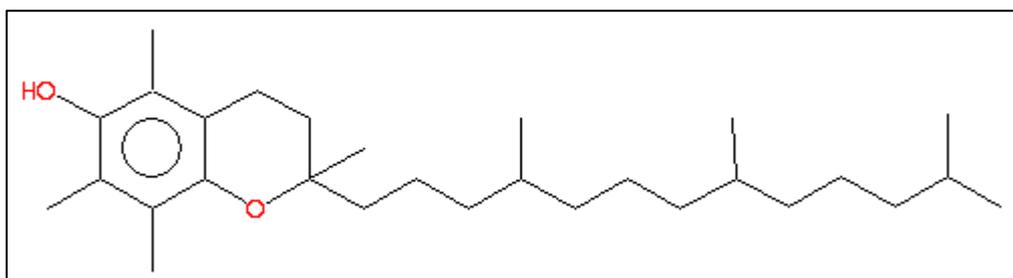


Figure 29: Structure des tocophérols

- **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 29:

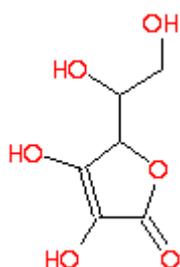


Figure 30: Structure de l'acide ascorbique

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 :

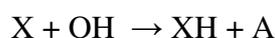
- La structure et les propriétés antioxydantes ;
- La solubilité et les coefficients de partage ;

- 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⁻, H₂O₂) 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 Cu^{+2} comme agent oxydant.
- Test au 2,2-Diphenyl-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**).

➤ ***Chapitre 5 : Activité antimicrobienne***

Introduction

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles se trouve à la base des médecines dites alternatives, de nombreux procédés utilisés dans la conservation des produits alimentaires crus ou cuits, de substances actives exploitées dans les produits pharmaceutiques. Les effets antimicrobiens de différentes espèces d'herbes et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ainsi, les huiles essentielles et leurs composants, actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "généralement reconnus comme sains" (Generally Recognized As Safe GRAS), ou approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug Administration. Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments, mais cependant des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne.

1. Principaux agents antimicrobiens

Ce sont des substances dont le contact, dans des conditions définies avec les microorganismes, entraîne, soit l'arrêt de leur multiplication, soit leur mort. Chaque agent est défini par son spectre d'activité

1.1. Agents physiques

La plupart des agents antimicrobiens physiques sont efficaces sur l'ensemble des micro-organismes. Parmi ces agents, on peut citer:

➤ **La chaleur** : L'utilisation de la chaleur est un procédé très efficace pour la destruction des micro-organismes. Très utilisés au laboratoire pour les milieux de culture et le matériel, les traitements thermiques sont à la base de la conservation de nombreux aliments.

➤ **Le froid** : Le froid entraîne le ralentissement de la croissance et des transformations microbiennes. La congélation et la surgélation par exemple permettent une stabilité totale vis-à-vis des micro-organismes et entraînent une mortalité plus au moins importante.

➤ **Les radiations électromagnétiques** : Les rayonnements électromagnétiques couvrent une large gamme de longueurs d'onde: les rayonnements infrarouge et les ultra-violet, les rayons X, les rayons γ , etc.

1.2. Les agents chimiques

Ils ont un pouvoir bactéricide et fongicide lié à la présence de composés phénoliques,

d'alcools, etc...

➤ **Les alcools** : Les alcools supérieurs ont un pouvoir bactéricide qui augmente avec leur masse molaire, mais leur solubilité dans l'eau diminue en parallèle, ce qui limite leur usage.

➤ **Le phénol et ses dérivés** : Le phénol et ses dérivés sont très utilisés à cet effet, car ils agissent à des concentrations très basses. Ils sont utilisés en médecine comme désinfectants et agissent par dénaturation des protéines de la membrane cytoplasmique (**Schoderet et al., 1989**).

1.3. Agents biologiques

Ils peuvent se traduire par la production de métabolites comme les acides et les antibiotiques. Certains micro-organismes sont considérés comme prédateurs pour d'autres.

➤ **Les HE** : Elles ont un pouvoir bactéricide et fongicide lié à la présence de composés phénoliques, d'alcools, etc. Ces huiles peuvent être remplacées par leur(s) composé(s) actif(s): thymol, carvacrol ... ect.

➤ **Les enzymes** : Divers enzymes lytiques pourraient jouer un rôle dans la protection des aliments contre les microorganismes. Elles pourraient avoir des applications dans la conservation spécialement quand les bactéries sporulantes sont à craindre (**Bourgeois et al., 1996**).

2. Détermination de l'activité antimicrobienne

La technique de détermination de l'activité antimicrobienne des HE a une grande influence sur les résultats. Les difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants de ces huiles dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à de faibles concentrations et des problèmes de standardisation des méthodes (**Hulin et al., 1998**).

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés :

- Selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'HE, soit liquide, solide ou gazeux ;
- Selon la nature du contact de l'HE avec le germe: diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant.

2.1. Principales méthodes

Les principales techniques actuelles de détermination du pouvoir antimicrobien des

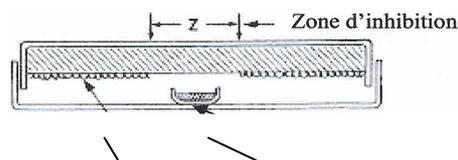
HE se divisent en deux grands groupes:

2.1.1. Technique de micro-atmosphère

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné d'HE au centre du couvercle d'une boîte de pétri, sans que l'HE entre en contact avec la gélose ensemencée par les micro-organismes. La boîte est hermétiquement fermée.

Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non du l'inoculum.

Cependant cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des HE, elle montre seulement l'activité des constituants volatils à la température d'incubation (**Bouchiki, 1994**).



Croissance des microorganismes

Huile essentielle

Figure 31: Illustration de la méthode des microatmosphères

2.1.2. Techniques par contact direct

Elles consistent à mettre en présence de l'HE les microorganismes, puis d'observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé ou liquide.

L'aromatogramme ou encore méthode des disques est l'une de ces méthodes.

a. Aromatogramme

Cette méthode a l'avantage de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale. Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester.

Les disques sont ensuite déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les bactéries se développent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'HE suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'HE. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (**Fauchère et Avril, 2002**).

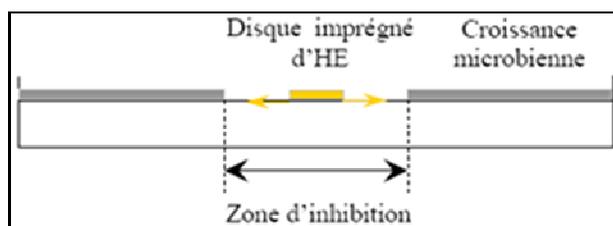


Figure 32: Schéma simplifié du principe de la méthode des aromagrammes.

b. Méthode du puits ou cylindre

Cette méthode assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable (**Bennett et al., 1966**). Elle consistait à découper un trou circulaire vertical dans la gélose et à y verser une solution d'HE de concentration connue. L'HE diffusant radialement crée une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne (**Dorman et Deans, 2000**).

c. Méthodes de dilution et microméthode

Les HE à traiter peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de micro-organismes et, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture; la lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (**Giamperi et al., 2002**). Par ailleurs, des microméthodes en milieu liquide ont été mises au point par **Delaquis et al., 2002**. Ce genre de méthode sert à la détermination des paramètres définissant l'activité antimicrobienne en introduisant des concentrations connues dans le milieu.

2.1.3. La CMI et CMB

La force relative d'un antimicrobien est déterminée par des dilutions en séries. Plus le produit est dilué en restant inhibiteur de la croissance du microorganisme, plus il est puissant. La plus faible concentration qui inhibe la croissance est appelée concentration minimale inhibitrice "CMI" (**Perry et al., 2004**). Fréquemment, la CMI n'est pas totalement bactéricide, de ce fait, une partie de l'inoculum sera capable de se développer après disparition du composé inhibiteur.

Cette technique consiste à inoculer, par un *inoculum* standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme

permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne. Ceci a amené à définir un autre paramètre, la "CMB" (concentration minimale bactéricide) qui est déterminée en milieu liquide par l'évaluation des survivants après élimination du composé inhibiteur (**Hulin et al., 1998**). La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'*inoculum* bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle.

2.1.4. Limite de ces méthodes

Quelle que soit la méthode de contact directe choisie, ces techniques, fiables pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, posent un problème de diffusion, d'homogénéité et de dispersion avec les HE, en raison de leurs très faibles solubilités dans les milieux de culture aqueux. Un certain nombre de solutions ont été proposées. La technique de diffusion en gélose peut être améliorée par l'ajout des détergents qui facilitent la diffusion des HE dans la gélose (**Deans et Ritchie, 1987**). Pour la méthode de contact en milieu liquide, il faut disperser les HE dans une solution de détergent (Tween 80) ou solubiliser les HE dans l'éthanol avant de les introduire dans le bouillon de cultureensemencé en micro-organismes (**Kim et al., 1995**). Avec des solvants (éthanol) ou des détergents (Tween 80), la dispersion des HE dans les milieux liquides est homogène et la diffusion dans les milieux gélosés est meilleure. Toutefois, les CMI et les CMB obtenues dans ces conditions sont-elles dues aux HE seules, ou au mélange des HE avec les détergents ou les solvants? Selon les détergents et les solvants et selon les concentrations auxquelles ils sont employés, les CMI et les CMB varient (**Bowles et al., 1995**).

3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est sous la dépendance d'un certain nombre de facteurs qui la favorisent ou l'inhibent :

3.1. Nature et état du micro-organisme

Toutes les espèces ne sont pas également sensibles vis-à-vis d'une substance, et dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Un agent antimicrobien est caractérisé par son spectre d'activité, c'est-à-dire le nombre d'espèces

vis-à-vis desquelles son pouvoir bactériostatique ou bactéricide s'exerce (**Leclerc et al., 1995**). L'état physiologique de la bactérie joue aussi un grand rôle: les microorganismes sont plus sensibles en phase exponentielle qu'en phase stationnaire envers les antimicrobiens chimiques, le phénomène pouvant être inverse pour des agents physiques. Les formes sporulées sont beaucoup plus résistantes aux agents physiques ou chimiques que les formes végétatives (**Guiraud, 2003**).

3.2. Nature de l'agent antimicrobien

Les différents agents ont une efficacité et un spectre d'activité variable. Pour les agents physiques, l'activité microbicide augmente souvent avec la dose alors que pour les agents chimiques les effets seront d'abord bactériostatiques puis bactéricides. L'activité de certains agents dépend de leur stabilité ; pour d'autres (hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène). L'activité est liée à leur décomposition.

3.3. Rôle de l'environnement

L'environnement peut influencer considérablement l'efficacité des agents antimicrobiens physiques et chimiques. Pour les agents chimiques, la solubilité dans l'eau est un facteur déterminant. La température, le pH du milieu, la turbidité, la viscosité, l'épaisseur, la dureté de l'eau et les matières organiques jouent aussi un rôle important.

4. Les propriétés des agents antimicrobiens

4.1. Critères de choix

Le choix d'un agent désinfectant est délicat, ne sont évidemment utilisable dans l'industrie alimentaire ou traitement de l'eau que les agents qui n'entraînent pas de toxicité. Ce problème se pose peu pour les traitements physiques. Plusieurs autres conditions sont généralement requises : large spectre d'activité adapté à la flore du produit, faible coût, facilité d'utilisation (utilisable à faible concentration, ou facilement éliminable par rinçage, ou ne laissant pas de sous produits dangereux), absence de pouvoir corrosif,... etc. L'addition de produits chimiques (agents de traitements désinfectants ou conservateurs) est sévèrement réglementée.

4.2. Classification

Les rôles des agents antimicrobiens est d'inhiber la croissance des microorganismes ou de les détruire. Il existe de nombreux moyens de lutte de nature physique, chimique ou biologique. Les principaux traitements sont classés en traitement d'éliminations, de destructions et de stabilisations. Il faut distinguer les produits microbicides (germicides ou bactéricides) qui agissent par destruction (mort) des germes et les microbiostatiques (ou bactériostatiques) qui agissent sur leurs développement (stabilisation). Les produits utilisés pour les traitements des eaux sont microbicides, alors que dans l'industrie alimentaire on peut utiliser des agents, soit au cours de la fabrication (microbicides), soit dans le produit fini (microbicides et stabilisants). Des produits chimiques sont utilisés aussi pour le nettoyage du matériel et des locaux.

On appel désinfectant des agents capables de détruire le germes pathogènes (ou non) dans l'environnement (eau, sol, air,... etc.). Ce terme est généralement réservé aux substances agissantes sur des objets inertes. Il est possible d'utiliser les désinfectants à concentration et temps de contact élevés. On appel antiseptique des agents capables de détruire des microorganismes ou d'arrêter leurs développements (microbicides ou microbiostatiques). Ils sont habituellement utilisés en action locale chez êtres vivants. Les désinfectants et antiseptiques ne sont généralement pas administrés par voie orale en raison de leurs toxicités. On appel agents de conservation ou conservateurs alimentaires des substances additionnés aux aliments : ils ne sont pas toxiques pour le consommateur aux doses utilisées. On appel agents chimio thérapeutiques des substances actives sur les microorganismes mais peu ou pas toxiques aux doses employées, pour les autres cellules humaines ou animales et qui sont utilisées en médecine.

4.3. Agents d'éliminations

L'élimination des microorganismes peut être obtenue par des procédés mécaniques. Le lavage est un moyen simple mais toujours efficace : des microorganismes fixés ou « ou cachés » ne sont pas forcément éliminés. L'efficacité peut être améliorée à l'aide d'agent tensio actifs ou de produits désinfectants (eau chlorée). La décantation (éventuellement après un traitement de floculation ou d'agglutination) et la centrifugation au dessus de 5000g permettant de diminuer la charge microbienne de produits liquides : ces traitements permettent de faciliter des traitements ultérieurs. La filtration est

également utilisable à condition que le milieu ne soit pas visqueux et ne soit pas chargé de matière en suspension. Elle nécessite l'emploi de filtres organiques ou minéraux (filtres en céramiques, verre frité, membranes en acétate de cellulose ou en matériaux divers) dont le diamètre des pores est inférieur aux dimensions des microorganismes. L'avantage majeur de ces produits est de ne pas modifier les qualités organoleptiques des produits traités.

5. Activité antimicrobienne des HE

Le pouvoir antimicrobien des HE est lié à leur composition chimique, en particulier à leurs composés majeurs et sont d'ailleurs souvent remplacées par ces composés actifs.

5.1. Propriétés antibactériennes des HE

Deans et al., (1987) ont étudié l'effet de 50 HE de plantes sur 25 germes de bactéries, à quatre concentrations différentes, grâce à une méthode de contact direct en milieu solide (puits). Sous leur forme non diluée, toutes les HE inhibent un genre bactérien. Les neuf HE manifestant les propriétés inhibitrices les plus importantes sont les HE de l'angélique, du laurier, de la cannelle, du clou de girofle, du thym, de l'amande amère, de l'origan, du piment et du géranium. Elles inhibent plus de 20 genres de bactéries testées. Après séparation et identification de différents composés de l'huile essentielle, **Kim et al.,(1995) ; Adam et al., (1998)** ont démontré que différents constituants des HE possèdent des activités antibactériennes et que les constituants volatils majeurs ont les propriétés antimicrobiennes les plus importantes: carvacrol (composé volatil majeur de l'HE d'origan), thymol (composé volatil majeur de l'HE de thym) , linalool (composé volatil majeur de l'HE de la coriandre), eugénol (composé volatil majeur de l'HE de poivre et du clou du girofle).

5.1.1. Propriétés antibactériennes sur les bactéries pathogènes présentes parfois dans les aliments

Une étude portant sur l'activité antibactérienne des HE de onze épices turques dont l'origan, a été testé sur 17 bactéries pathogènes dont *Escherichia aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *P. fluorescens*, ceci par la méthode de diffusion sur disque en papier. L'activité antibactérienne des HE de six épices parmi les onze a été testée à quatre concentrations différentes (0.2, 0.4, 1 et 2%). Les différents résultats ont montré que toutes les préparations

présentaient une activité antibactérienne contre au moins une bactérie, et qu'en général, les HE testées aux concentrations de 1 et 2% étaient les plus efficaces, surtout celles de la marjolaine, du thym et de l'origan (*Özkan et al., 2003*).

5.1.2. Propriétés antibactériennes sur les bactéries utiles à la transformation des aliments

Une HE utilisée comme conservateur alimentaire doit se montrer inoffensive pour les bactéries utiles à la transformation alimentaire, notamment les ferments d'acidification, d'aromatisation ou d'affinage. **Canillac et Mouret (1996)** ont travaillé sur l'effet des HE du pin et du sapin sur des microorganismes d'affinage tels *Brevibacterium linens* et *Kluyveromyces lactis*, afin de valider leur emploi comme agents anti-*Listeria*. À 1%, l'HE du pin élimine plusieurs de ces microorganismes notamment, *Listeria sp.*, celle du sapin est bactéricide pour *Listeria sp.* et *Micrococcus sp.* Par contre, à 0,28%, l'HE du sapin est certes, bactériostatique pour *Listeria sp.* mais n'empêche pas la multiplication d'autres microorganismes d'affinage et d'aromatisation (**Hulin et al., 1998**).

5.1.3. Mécanisme d'action sur les bactéries

Plusieurs études ont montré l'apparition de fuites d'ions potassium K^+ de cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec du Tea-tree (*Melaleuca alternifolia*). Il s'agit de la toute première indication de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Des composés isolés tels le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries perméable, prémices de leur mort (**Lambert et Skandamis, 2001**). La faculté de perturber la perméabilité de la cellule membranaire, accompagnée de la perte de l'osmose chimique sont bien la preuve d'une activité létale de certaines HE (**Cox et Mann, 2000**).

5.2. Propriétés antifongiques des HE

Les champignons sont des contaminants fréquents des denrées alimentaires tels les céréales, les fruits séchés et les oléagineuses. Leurs toxines secrétées occasionnent souvent de graves atteintes à la santé humaine et animale.

5.2.1. Activité sur les moisissures

L'action inhibitrice de 5 HE (thym, sauge, eucalyptus, muscade, senné) a été testée à différentes concentrations (100-500 ppm) contre *Alternaria alternaria*. Les résultats obtenus

ont montré que les HE de senné et de thym avaient la plus forte activité antifongique. A 500 ppm, l'HE de senné a complètement inhibé la croissance d'*Alternaria alternaria*, tandis qu'à la même concentration, celle du thym ne l'a fait qu'à 62%. Une inhibition irréversible peut être obtenue par une exposition à l'HE de senné pendant 6 jours (300ppm) ou de 3 jours (500 ppm) (Feng et Zheng, 2007). Les HE de sept Labiacées marocaines ont été analysées chimiquement par CG/SM et évaluées in vitro pour leur activité antifongique contre *Botrytis cinerea*. Les HE de l'*Origanum compactum* ont totalement inhibé le développement de la moisissure et ceci à 100 ppm. Les deux principaux composés des HE des deux plantes et qui sont le thymol et le carvacrol, sont les plus inhibiteurs (100% d'efficacité) du développement de *Botrytis cinerea*, ceci à 100 ppm. (Bouchra et al., 2003). Donc, les HE pourraient être proposées comme agents antifongiques dans les traitements alimentaires pour prévenir la présence des aflatoxines, des ochratoxines ou des stérignatocystines.

5.2.2. Activité sur les levures

Les levures largement réparties dans la nature, sont capables d'altérer plusieurs types d'aliments tels que: les vins, le fromage, le vinaigre, les jus, les fruits, les salades, le sucre et la viande, causant ainsi des changements de l'odeur, couleur, goût et texture (Ray, 1996 in Souza et al., 2006). L'activité antifongique de l'HE d'*Origanum vulgare* L., a été évaluée en déterminant la CMI de l'HE par deux méthodes. Le test a été réalisé sur 7 levures de pourritures des aliments dont *Candida albicans* ATCC 7645, *Pichia minuscula* NI 7638 et *Rhodotorula rubra* LBFHC 1096. Les résultats ont montré que l'HE d'*Origanum vulgare* L. inhibait le développement de toutes les levures dans les deux méthodes, mais à des CMI variables (Souza et al., 2006).

6. Mode d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Figure 33).

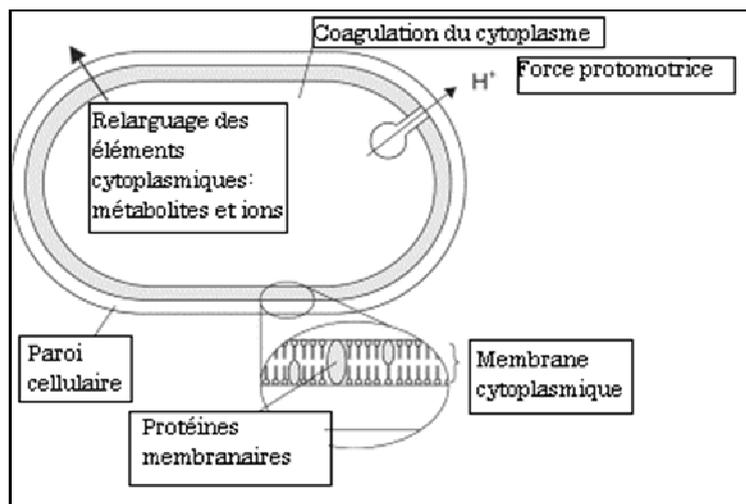


Figure 33: Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema *et al.*, 1994). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (Carson *et al.*, 2002 ; Ultee *et al.*, 2002). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire. Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes a été décrit dans la littérature. Le carvacrol et le thymol semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire (Lambert *et al.*, 2001). L'action du thymol a été étudiée sur des membranes artificielles (Trombetta *et al.*, 2005). Son efficacité dépend de la composition et de la charge nette de la membrane. Lorsqu'il pénètre dans la membrane plasmique, il semble altérer sa perméabilité et entraîner une perte du matériel intracellulaire. Les modes d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique. Cependant, la variabilité chimique des huiles essentielles laisse présager l'existence de molécules pouvant agir par de nouveaux mécanismes cellulaires.

7. Comparaison entre les antibiotiques et les huiles essentielles

L'étude comparative entre les antibiotiques et les huiles essentielles est représentée dans le tableau 9.

Tableau 9: Représentation des différences existant entre les huiles essentielles et antibiotiques.

	Les antibiotiques	Les huiles essentielles
Historique	L'apparition des antibiotiques dans l'évolution globale de l'humanité ne représente pas la durée d'un « clin d'œil »	L'usage des HE est une constante retrouvée dans toutes les ethnies à toute époque et surtout les continents.
Chimiquement	Constitué d'une molécule unique	Sont constituées de multiples molécules leur conférant des propriétés variées.
Origine	Ils sont issus d'êtres vivants, mais principalement des moisissures hétérotrophes, tirant leur énergie de la dégradation de substances.	Les essences sont issues du métabolisme de plantes supérieures, chlorophylliennes, donc autotrophes.
Résistances aux micro-organismes	Dans la mesure où l'antibiotique est constitué d'une seule molécule, il est aisé pour une bactérie de synthétiser une enzyme ou une autre molécule le rendant inactif.	Les microorganismes sont incapables de rendre les HE inactives.
Toxicité	Certaines molécules présentent une toxicité sévère.	Rarement toxique

8. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles :

Selon **Hulin et al., (1998)** les facteurs influençant les propriétés antimicrobiennes des HE sont:

8.1. Effet de la température

Moleyar et Nasimham (1992) et Bowls et al., (1995) ont montré respectivement que la température affecte les propriétés d'inhibition de l'aldéhyde cinnamique quand la température augmente de 20°C à 30°C et, augmente les propriétés antibactériennes des carbonyles aromatiques et aliphatiques lorsque la température baisse de 37°C à 12°C.

8.2. Le pH

Sur 11 composés étudiés dont l'eugénol, le maltol et le menthol, **Jay et Rivers (1984)** ont constaté une augmentation de l'activité de tous les composés à pH 6 par rapport au pH 8. À pH 5 et à la température d'incubation de 5°C, 0,01 g/l de diacétyl suffisent pour inhiber *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus faecalis*, alors qu'à 15°C, 0,078 g/l et 0,156 g/l sont respectivement nécessaires pour inhiber ces microorganismes.

9. Applications des HE sur les aliments

Trois HE (thym, ail, piment) ont été étudiées pour leur pouvoir antibactérien sur des saucisses de hot-dog contre *Listeria monocytogenes*. Les tests ont porté sur trois genres de saucisses: 0%, 9% et 26% de matière grasse. Les résultats obtenus montrent que le thym à une concentration de 1 ml/l inhibait parfaitement le développement dans les deux premiers genres et non dans le troisième, alors qu'à la même concentration, l'ail inhibait le développement dans les trois genres.

Les propriétés organoleptiques d'une viande de bœuf hachée contenant 1% (volume/poids) d'HE d'origan ont été améliorées durant un stockage sous un emballage sous vide et sous une atmosphère modifiée à 5°C (**Oussalah et al., 2006**). Le développement d'*Alternaria alternaria* a été considérablement inhibé sur des tomates fraîches traitées avec de l'HE de senné et entreposées pendant 5 jours à 25°C. Le pourcentage de tomates pourries traitées avec 500 ppm d'HE était de 19,1% (**Feng et Zheng, 2007**). Un concentré de tomate

inoculé avec *Aspergillus flavus* puis traité avec 500 ppm d'HE de thym et entreposé à 25°C pendant deux mois gardait tout son goût et son arôme en plus de l'inhibition d'*Aspergillus flavus* (**Omidbeygi et al., 2007**).

En présence d'eugénol, composé majeur de l'HE du clou de girofle, la production d'aflatoxines dans les grains de maïs traités diminue d'environ 60 % par rapport aux témoins (**Hulin, 1998**). D'après **Caillet et Lacroix (2007)**, certains facteurs comme la température, les conditions de stockage, le pH ou la composition de l'aliment, peuvent avoir une influence sur l'action des HE. Il est établi que l'efficacité de l'huile augmente avec la diminution du pH de l'aliment, de la température de stockage ou encore de la quantité d'oxygène dans l'emballage. Cela est d'autant plus intéressant que les quantités d'huile nécessaires pour le contrôle de la croissance bactérienne dans les aliments conservés à basse température pourraient être réduites. Il est également prouvé qu'une même huile sera plus efficace dans un aliment pauvre en gras et/ou en protéines. Les fortes teneurs en eau et en sels d'un aliment vont aussi favoriser l'action de l'HE, alors qu'une structure gélatineuse va au contraire la limiter.

II. Partie pratique

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

➤ ***Chapitre 1 : Matériels et méthodes ;***

1. Matériel végétal:

Les plantes étudiées dans ce travail appartiennent à quatre familles botaniques différentes: Cupressacées, Astéracées, Apiacées et Lamiacées. Le Tableau 10 présente l'origine et la date de récolte des différents échantillons naturels. Dans tous les cas, l'identification botanique a été faite au niveau de l'Herbier du Département de Botanique à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

Tableau 10: Origine et date de récolte des échantillons de plantes étudiées

Nom commun	Nom scientifique	Famille botanique	Partie récoltée	Lieu de récolte	Date de cueillette
Genévrier de Phénicie, Genévrier rouge	<i>Juniperus phoenicea</i> L.	Cupressacées	Feuilles	Sétif	Août 2009
			Fruits	Sétif	Août 2009
Aneth	<i>Anethum graveolens</i>	Apiacées	Fruits	Birkhadem	Août 2011
Lavande	<i>Lavandula soechas</i> L.	Lamiacées	Feuilles+ Fleurs	Azzazga (Tizi-ouzou)	Avril 2011
Erigéron de Canada	<i>Conyza canadensis</i> L.	Astéracées	Feuilles	El-Harrach	Juin 2013

Après la récolte, le matériel végétal est étendu sur place en couche fine pour qu'il sèche à l'air libre. Ceci permet de minimiser les divers mécanismes de fermentation et de dégradation inhérents au caractère organique de ces matières premières.

2. Matériel entomologique :

Le but de cet élevage est l'obtention des adultes de *Callosobruchus maculatus* utilisés 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.

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.



Figure 34: L'élevage de *Callosobruchus maculatus* F. dans des bocaux en verre à l'intérieur de l'étuve.

3- Matériel microbiologique:

L'activité antimicrobienne des HE étudiées a été testée sur 5 micro-organismes (4 bactéries pathogènes et 1 levure), qui sont tous de souches pures et issues de la collection du **CRD-SAIDAL**. Le tableau 11 illustre les principales infections causées par ces micro-organismes.

Tableau 11: Caractéristiques des souches microbiennes testées

	Souche	Gram	ATCC*	Famille	Principales infections causées
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	6538	Micrococcaceae	- Gastro-entérites ; - Infections urinaires -L'ostéomyélite et l'arthrite
	<i>Bacillus subtilis</i>		9372	Bacillaceae	- Gastro-entérites.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	9027	Pseudomonadaceae	- Crampes abdominales; - Troubles digestifs.
	<i>Escherichia coli</i>		4157	Enterobacteriaceae	- Diarrhées dysentériques. - Gastro-entérites.
Levures	<i>Candida albicans</i>	/	24433	Cryptococcaceae	- Lésions cutanées ; - Infections oesophagiennes - Infections génitales.

*ATCC : American Type Culture Collection

4. Extraction des huiles essentielles:

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée en utilisant deux techniques :

4.1. Extraction par hydrodistillation:

Les extractions ont été réalisées à partir d'une matière sèche et broyée au laboratoire de Chimie de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, à l'aide d'un appareil de type Clevenger-modifié (figure 35).

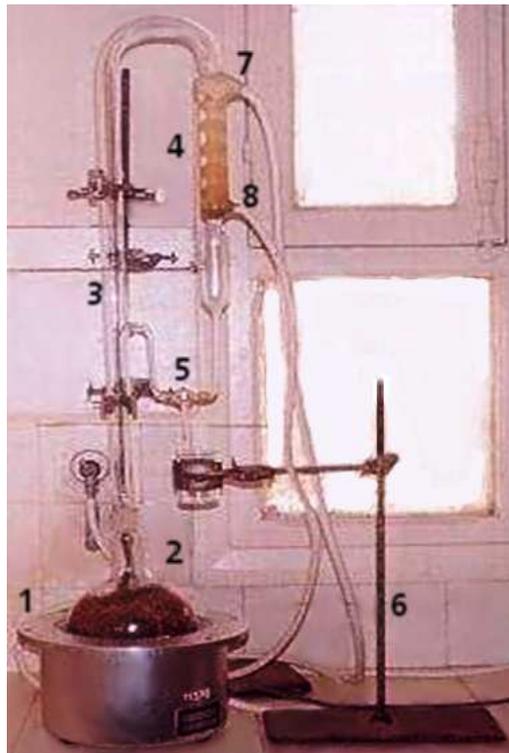


Figure 35 : Montage de l'appareil de CLEVINGER modifié

1 : Calotte chauffante.

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

3 : Colonne en verre.

4 : Réfrigérant.

5 : Robinet réglable.

6 : Support métallique.

7 : Entrée eau froide.

8 : Sortie eau chaude

➤ **Mode opératoire :** Pratiquement, pour chaque partie de la plante étudiée, 100 grammes de matière végétale ont été introduits dans le ballon de 2 litres rempli d'eau distillée

jusqu'aux 2/3 de sa capacité, puis le tout est porté à ébullition pendant 3 heures à partir de l'obtention de la première goutte de distillat. L'huile essentielle obtenue est séparée de l'eau par simple décantation. Aucun solvant organique n'est utilisé au cours de ce protocole. L'huile essentielle recueillie est séchée à l'aide du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toute trace d'eau. Les huiles essentielles sont conservées au réfrigérateur à l'abri de la lumière et à une température de 4°C en vue de leur analyse et leur utilisation pour les tests d'activité antioxydante.

4. 2. Extraction par hydrodistillation assistée par micro-ondes :

Dans le but de connaître l'influence du procédé d'extraction sur la composition chimique de l'huile, une extraction par hydrodistillation sans solvant assistée par micro ondes a été réalisée sur les fruits (baies) de *Juniperus phoenicea* au Laboratoire d'analyse fonctionnelle à l'Université des Sciences et de Technologie Houari Boumediene.

➤ Mode opératoire :

100 g de baies broyées à l'aide d'un robot électrique sont introduites, sans ajout d'eau ni de solvant organique, dans un réacteur (ballon d'une contenance de 500 ml) placé dans la cavité multimode du four micro-ondes représenté dans la figure et schématisé dans les figures 36 et 37.



Figure 36: Montage de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes.

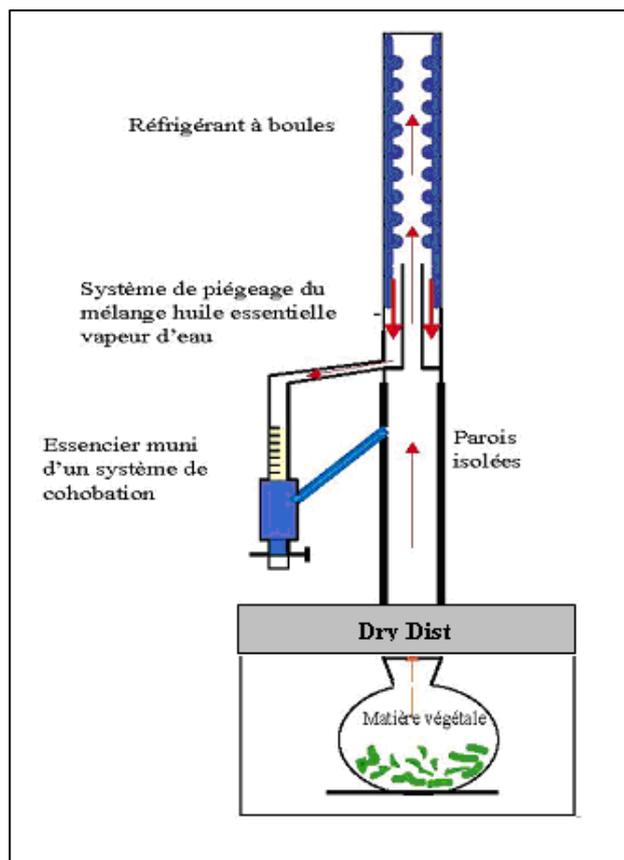


Figure 37: Schéma du montage de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes.

La durée de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes a été fixée après les observations de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle. Il est apparu qu'après 30 minutes d'extraction, la totalité de l'huile essentielle est pratiquement extraite. La durée totale d'une extraction sans solvant assistée par micro-ondes a donc été fixée à 30 minutes comprenant l'étape de chauffage.

Grâce au système de cohobation, le taux d'humidité au sein du ballon reste constant tout au long de l'extraction. La température initiale au sein du réacteur est voisine de la température ambiante du laboratoire soit 20°C. Par la suite, grâce au chauffage, la température de la matrice augmente jusqu'à atteindre la température d'ébullition de l'eau 100°C.

Les expériences d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes menées lors de ce travail sont exclusivement réalisées à pression atmosphérique.

Ces conditions sont résumées dans le tableau 12.

Tableau 12: Conditions opératoires utilisées lors de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes :

Masse végétale (g)	250
Puissance MO maximale (W)	1000
Temps de chauffe (min)	2,3
Durée totale de l'extraction (min)	30

4.3. Rendement de l'extraction:

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport du volume d'huile essentielle récupéré et de la matière végétale séchée, il est exprimé en pourcentage et donné par la relation suivante :

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

V_{HE} : Volume d'huile essentielle récupéré.

5. Extraits éthanoliques:

Les plantes séchées entières ont été broyées après refroidissement par de l'azote liquide. Elles ont ensuite été extraites trois fois par du méthanol (EthOH) en utilisant une technique d'extraction solide-liquide par Soxhlet (figure). Chaque extraction a été effectuée avec au minimum 24 heures d'agitation à température ambiante dans une proportion d'à peu près 1 litre de solvant pour 200 g de plante. Les solvants ont été évaporés à basse pression dans un vaporisateur rotatif de type (Rotavapor) et les extraits finalement séchés au lyophilisateur sont pesés et conservés à 4-6°C jusqu'à leurs utilisation.

Le taux d'extraction est calculé comme suit :

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

P_1 : poids du ballon après évaporation du solvant (g).

P_0 : poids du ballon vide (g).

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



Figure 38 : Montage de l'appareil de Soxhlet

6. 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 baies) de l'espèce étudiée, une observation de la structure anatomique des deux organes est nécessaire, ainsi des coupes transversales au niveau des feuilles et des baies ont été réalisées.

La préparation de ces coupes a eu lieu au niveau du laboratoire de botanique de l'École Nationale Supérieure Agronomique. Une moelle de sureau a été utilisée afin d'obtenir des coupes suffisamment minces pour pouvoir les observer sous microscope photonique. Les différentes étapes sont :

- Un prétraitement pendant 20 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium (Eau de Javel) à 12° pour vider les cellules de leur contenu.

- Un rinçage dans de l'eau distillée durant 1 à 5 min, puis dans de l'acide acétique à 5 % pendant 5 min.
- Une coloration des coupes en utilisant le carmino-vert qui permettra de différencier les parois cellulosiques (couleur rose) et les parties lignifiées (couleur verte).

Ensuite les coupes ont été montées dans une goutte d'eau entre lame et lamelle et observées au moyen d'un microscope photonique équipé d'un appareil photo AUS JENA JENALUMAR.

8. Analyse des huiles essentielles:

8.1. Analyse semi-quantitative par CPG:

- L'analyse semi-quantitative par CPG des échantillons d'huiles essentielles a été effectuée au laboratoire d'analyse instrumentale du département de Technologie Alimentaire de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique selon les conditions opératoires suivantes : Appareil de type CP Chrompack 9002.

Colonne capillaire : 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 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 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 μl dans le mode d'injection split avec un rapport de division de 1/50.

La préparation de la table des n-alcanes pour la mesure des indices de Kovats des composées identifiés dans les huiles essentielles a été réalisée comme suit: Solution des n-alcanes de C₈ à C₂₆ (origine: Aldrich et Fluka Chemicals) à 5% dans le pentane. Soit 0,1 g de chaque alcane dans 20 ml de pentane, conservé au réfrigérateur.

L'identification des composés a été effectuée par comparaison de leurs indices de rétention (indices de Kovats) et des spectres de masse ions-fragments caractéristiques obtenus expérimentalement à ceux cités dans la littérature et/ou inventoriés dans les banques de bibliothèques spectrales (Wiley7, Nist 2002).

- **Mode d'identification :**

L'identification des composés a été réalisée par comparaison des indices de rétention en programmation de température à ceux cités par la littérature ainsi qu'à ceux d'étalons injectés dans les mêmes conditions. Pour le calcul de ces indices, un mélange d'alcane ($C_6 - C_{24}$) est injecté dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon. Les indices de rétention désignés par IK sont calculés selon la formule suivante :

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

t_{RC} : temps de rétention du composé étudié ;

t_{Rz} : temps de rétention de l'alcane à z atomes de carbone qui précède le composé étudié ;

t_{Rz+n} : temps de rétention de l'alcane à $z+n$ atomes de carbone qui suit le composé.

n : différence des nombres d'atomes de carbone.

8.2. Analyse qualitative des huiles essentielles par CPG/MS :

Les huiles essentielles récupérées à partir des différents échantillons ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse seule sur un appareil de marque Hewlett Packard G 6890, couplée à un Spectromètre de Masse (MS-5973 N, HP Agilent Technologies).

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).

➤ 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 μ 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 µl; selon un mode d'injection: Split à une température de 250°C.

Sur colonne polaire :

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

9. Analyse chimique des extraits éthanoliques:

9.1. Dosage des composés phénoliques :

Dosage des phénols totaux :

L'évaluation de la teneur en phénols totaux a été réalisée selon la méthode de Folin Ciocalteu. 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 (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel (**Riberau-Gayon, 1968**).

La teneur en composés phénoliques est estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**). Un volume de 1ml d'extrait est dilué dans 2ml de solvant d'extraction. Ensuite, 100 µl de cet extrait dilué sont mélangés avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 minutes, 1 ml de la solution de carbonate de sodium est 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 et sera exprimée en g équivalent d'acide gallique dont la structure est la suivante :

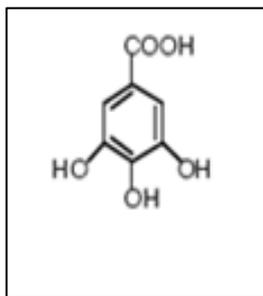


Figure 39: Structure de l'acide gallique

9.2. Dosage des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes est estimée selon la méthode au AlCl_3 (**Lamaison et Carnet, 1990**) modifiée. 1ml de l'extrait dilué est ajouté à 1 ml de la solution éthanolique de chlorure d'aluminium. Après 1h 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 obtenue en utilisant la **quercétine** et sera exprimée en g/100 g d'échantillon.

10. Activité biologique des huiles essentielles et extraits étudiés:

10.1. Evaluation de l'activité antioxydante:

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par deux méthodes parmi celles citées par la littérature. Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles et de l'extraits testés est estimé par comparaison avec un antioxydant de synthèse le **BHT**. Tous les tests ont été réalisés avec **3** répétitions pour chaque concentration.

10.1.1. 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 la température ambiante. Dans le test du DPPH, le piégeage du radical **DPPH** (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est suivi par la 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 **IC₅₀** 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 λ à la longueur d'onde de 517 nm. La solution de DPPH a été obtenue en dissolvant 2.4 mg de la poudre dans 100 ml de C₂H₅OH. Le **BHT** a été utilisé comme témoin positif (référence de comparaison). Ensuite, 50 μ L de chaque échantillon (huile essentielle ou extrait ou BHT) et pour chaque concentration ont été ajoutés à la solution de DPPH pour former un volume total de 2 ml. La mesure de la variation de l'absorbance a été faite 20 min après l'introduction de la cuve dans le spectrophotomètre.

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

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

Où : **A_{blanc}** : Absorbance du témoin (nm), il représente l'absorbance du DPPH au temps zéro avant addition de l'échantillon d'huile essentielle.

A_{éch} : Absorbance de l'échantillon testé (nm).

Le graphique de la variation de l'absorbance en fonction de la concentration a permis de déterminer l'IC₅₀ (concentration correspondant au piégeage de 50 % des radicaux libres).

10.1. 2. 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-Fe⁺³ en fer ferreux. 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 extraits de *Juniperus phoenicea* sont regroupées dans la figure 40.

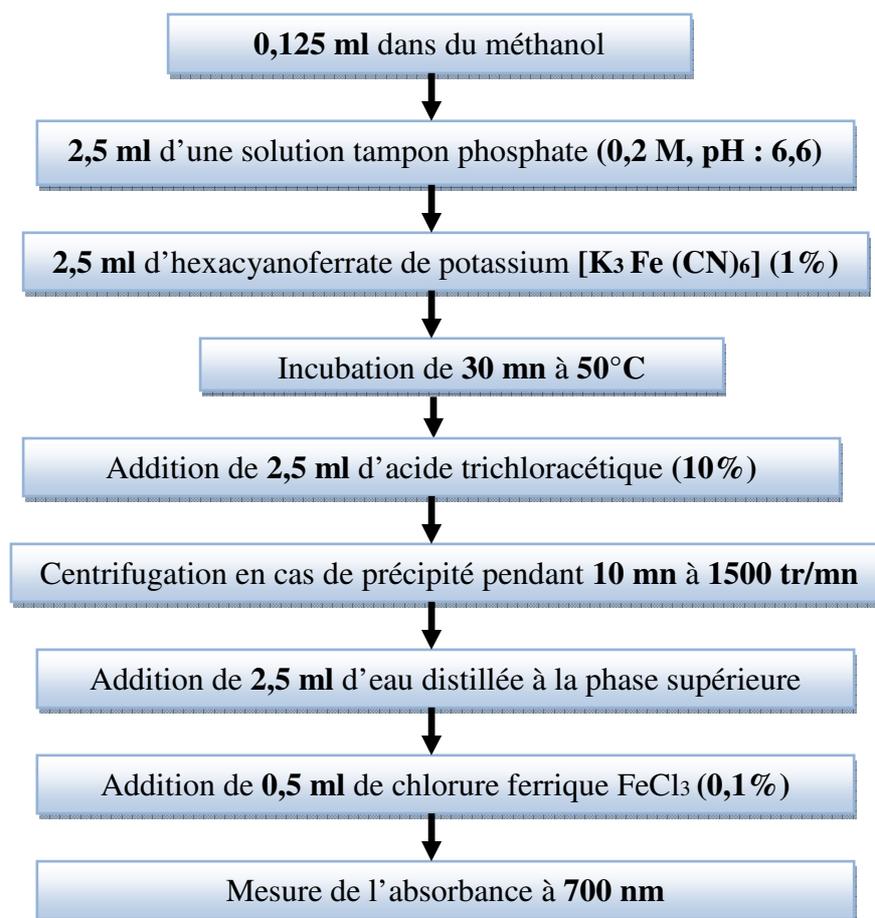


Figure 40: Protocole de mise en œuvre du test du pouvoir réducteur

10.2. Estimation de l'activité insecticide sur *Callosobruchus maculatus* F.

10.2.1. Objectifs :

Evaluer l'activité et insecticide de l'huile essentielle 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.

10.2.2. Critères d'évaluation retenus:

L'activité insecticide des de l'huile essentielle de *L. stoechas* 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.

10.2.3. Matériel végétal:

La plante utilisée pour l'extraction des huiles essentielles pour nos tests insecticides est la lavande (*Lavandula stoechas* L.)

10.2.5. Essais d'efficacité des huiles essentielles sur *Callosobruchus maculatus*:**➤ 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 $2 \mu\text{l/ml}$ d'acétone, qui est une dose suffisante pour saturer l'atmosphère interne des petits pots cylindriques (de $3,67 \text{ cm}$ de diamètre et de $6,5 \text{ cm}$ de hauteur) c'est-à-dire d'un volume de $68,72 \text{ cm}^3$. La quantité de l'huile essentielle choisie correspond à une dose de $(0,0291 \mu\text{l/cm}^3)$ 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 ($2 \mu\text{l}$) a été déposée sur un disque de papier filtre Wattman 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).

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.

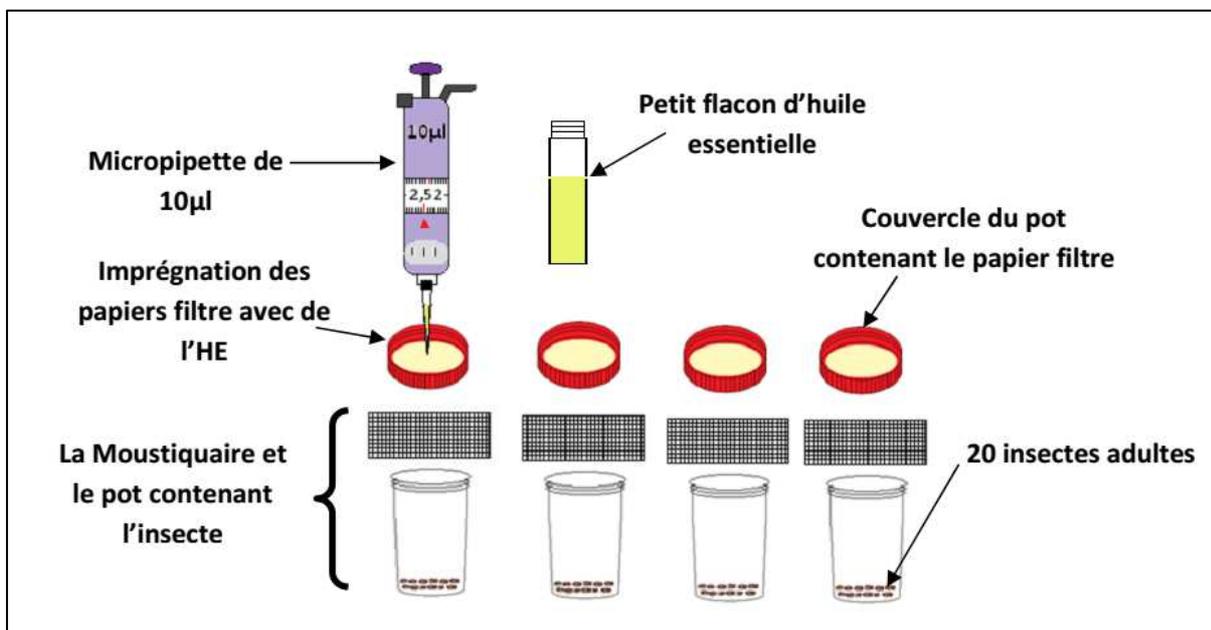


Figure 41: Traitement des insectes par les huiles essentielles pour le test inhalation

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.

➤ **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/g de 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.

➤ **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).

➤ **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 à l'huile essentielle extraite *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.

10.2.6. Expression des résultats :

➤ 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 ;

Mt : pourcentage de mortalité moyenne d'insectes dans l'échantillon témoin.

➤ 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.

1. 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 entraîné par le toxique à une concentration bien déterminée. Les TL50 TL90 sont fixés par les droites de régression des tests d'inhalation.

2. Détermination des doses létales 50 et 90 :

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

➤ 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 \pm écart-type et ont été comparés au test témoin.

➤ **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

10.3. Evaluation activité antimicrobienne

10.3.1. Etude qualitative : détermination de l'effet inhibiteur des HE

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE étudiées, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose appelés aromatogrammes. Les tests ont été réalisés au niveau du CRD-SAIDAL (El Harrach, Alger). Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des ATB «Pharmacopée Européenne, 2002 ». La méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisée auparavant par plusieurs chercheurs, **Chao et al. (2000)** et **Ozcan et al., (2003)**.

10.3.1.1. Principe :

La méthode des aromatogrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose (dans notre cas: disque de 6 mm de diamètre) imprégné d'une quantité bien définie de l'HE à tester, à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec le micro-organisme testé. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone claire autour du disque, appelée: zone d'inhibition (Figure 42).

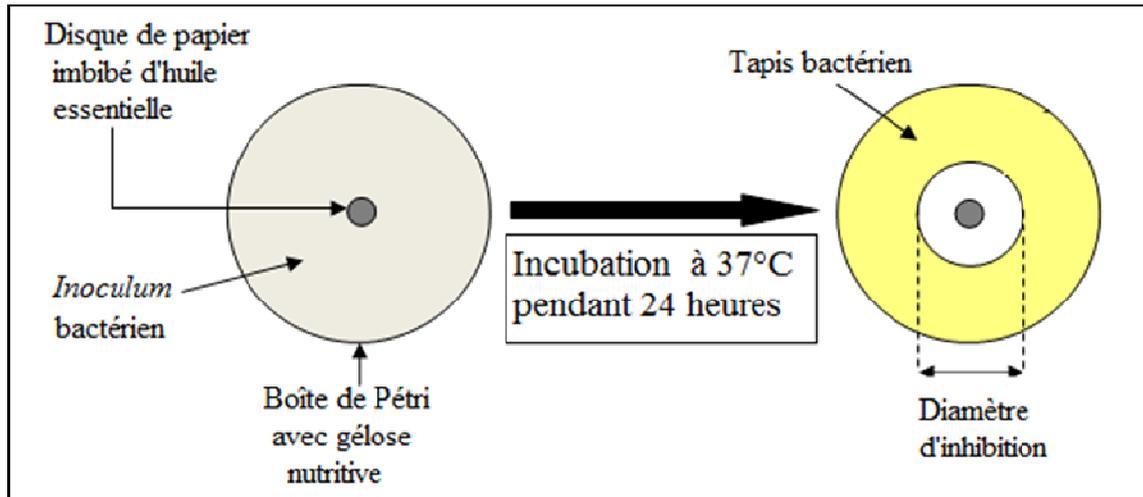


Figure 42: Principe de la méthode de diffusion par disque.

10.3.1.2. Micro-organismes testés

L'activité antimicrobienne des HE étudiées a été testée sur 5 micro-organismes (4 bactéries pathogènes et 1 levure), qui sont tous de souches pures et issues de la collection du **CRD-SAIDAL**.

10.3.1.3. Protocole expérimental

Préparation des milieux de culture Selon **Giraud (271)**.

➤ Milieu Mueller-Hinton

Pour préparer 1L de milieu de culture, il faut :

- Extrait de viande (2 g) ;
- Hydrolysate acide de caséine (17,5 g) ;
- Amidon (1,5 g) ;
- Gélose (10 g).

Les différents ingrédients sont ensuite mélangés puis autoclavés pendant 15 minutes à 115 °C. À la sortie de l'autoclave, le milieu qui doit être de pH 7.4, est réparti dans des flacons de 250 ml.

➤ Milieu Sabouraud gélosé

C'est un milieu Sabouraud-glucose constitué lui-même d'un bouillon gélosé à 2 %. L'addition de la gélose ne s'opère qu'après la préparation du milieu Sabouraud-glucose qui a comme ingrédients : peptone de viande (5 g), peptone de caséine (5 g) et du glucose (20 g). Le milieu Sabouraud-glucose qui doit être de pH 6,3, est réparti en tubes à essais de 9 à 10 mL, ces derniers sont ensuite autoclavés pendant 20 minutes à 120 °C.

I. Préparation de la première couche de milieu

On fait fondre les milieux Mueller-Hinton et Sabouraud dans un bain marie à 95°C, après on verse aseptiquement une première couche des deux milieux dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte, on laisse refroidir et solidifier sur paillasse.

II. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18h pour les bactéries et de 48h pour les levures, on réalise des suspensions troubles en prélevant 3 à 4 colonies bien isolées et identiques, qu'on dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex. On réalise une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre en estimant la transmittance qui doit être comprise entre 22 et 32% pour les bactéries et entre 2 et 3% pour les levures et cela à une longueur d'onde de 620 nm.

Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondent à une concentration optimale de 10^7 - 10^8 germes/ml. Si une des valeurs trouvée à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle, on l'ajuste soit en ajoutant de l'eau physiologique (à 9% de NaCl) si elle est inférieure à la valeur minimale ou en ajoutant des colonies si elle est supérieure à la valeur maximale. A chaque fois une nouvelle lecture de transmittance est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées. L'inoculum doit être utilisé dans les 15mn suivant sa préparation.

III. Préparation de la deuxième couche du milieu

On fait fondre les deux milieux MH et SAB, on les laisse refroidir jusqu'à une température de 45°C et on transvase 50 ml de chaque milieu dans des flacons stériles. On ensemence les milieux avec 200 µl de chaque suspension et on agite manuellement; puis on dépose rapidement 4 ml de chaque milieu ensemencé sur la surface de la première couche (couche support) de gélose solidifiée. On étale immédiatement la couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et on laisse solidifier sur la paillasse.

IV. Les huiles essentielles utilisées

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, les huiles essentielles employées sont à l'état pur pour pouvoir les utiliser dans la technique de l'aromatogramme.

V. Dépôt des disques

À l'aide d'une micropipette, en utilisant des cônes stériles, on prélève 20 à 30 μ l d'huile essentielle pure, on dépose chaque quantité prélevée sur le disque posé préalablement à l'aide d'une pince stérile sur la surface de la gélose ensemencée, on laisse diffuser pendant 30 min. Et enfin, incuber à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures.

VI. Lecture des résultats

- Zones claires autour du disque : présence d'une activité inhibitrice des HE.
- Absence de zones claires autour du disque : pas d'effet inhibiteur des HE.

10.3.2. Etude quantitative : détermination de la CMI & CMB des HE

10.3.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

I. Principe

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la dernière ou la plus basse concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un micro-organisme après 24 h pour les bactéries et 48h pour les levures.

Son but est d'établir le niveau de sensibilité des pathogènes envers les agents anti microbien en l'occurrence les HE étudiées dans ce cas.

Cette CMI est déterminée selon la méthode des dilutions sur milieu gélosé : MH pour les bactéries et SAB pour les levures.

II. Protocole expérimental

➤ Préparation de l'inoculum microbien

A partir de culture jeune de 18h pour les bactéries et de 48h pour la levure, on prépare les solutions mères des souches à étudier en lisant l'absorbance à une longueur d'onde de 620 nm, qui doit correspondre à une DO entre 0.2 et 0.3 pour *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Basillus subtilis*, à une DO entre 0.3 et 0.4 pour *Staphylococcus aureus*, et une DO comprise entre 2-3 pour *Candida albicans*.

Préparer une série de dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-4} , en prélevant 1 ml de la solution mère auquel on ajoute 9 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la dilution 10^{-2} , procéder de la même façon jusqu'à la dilution 10^{-4} , c'est cette dernière qui sera utilisée pour la détermination de la CMI.

➤ **Préparation des dilutions d'HE de 2% à 0.03%**

On prépare une dilution d'HE à 2%, en diluant 1 ml d'HE pure (100%) dans 50 ml de milieu (MH et/ou SAB) liquide additionné de Tween 80 stérile dans le premier flacon. On réalise des dilutions de $\frac{1}{2}$ au $\frac{1}{2}$, en versant la moitié de la dilution 2% dans le deuxième flacon et compléter avec 25 ml de milieu ce qui donne la dilution 1%. On procède de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution 0.03%. Couler chaque dilution dans les boîtes de petri, laisser solidifier. (Pour les bactéries, chaque boîte est divisée en 4 correspondants aux quatre souches bactériennes). Déposer à la surface de la gélose les disques stériles, ensuite ensemercer au moyen d'une micropipette chaque suspension microbienne à raison de $3\mu\text{l}$.

N.B : un témoin positif (+) ne contenant que le milieu (MH et/ou SAB) additionné de Tween 80 plus $3\mu\text{l}$ l'inoculum doit être prévu pour chaque série de dilution d'HE. Un témoin négatif (-) ne contenant que le milieu (MH et/ou SAB) additionné de Tween 80 est également prévu.

a. Incubation

Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour la levure.

b. Lecture des résultats

La lecture des résultats se fait à l'œil nu, en indiquant la plus faible concentration inhibitrice d'HE, se traduisant par l'absence toute croissance bactérienne visible.

La figure 43 illustre le protocole expérimental utilisé pour la détermination CMI.

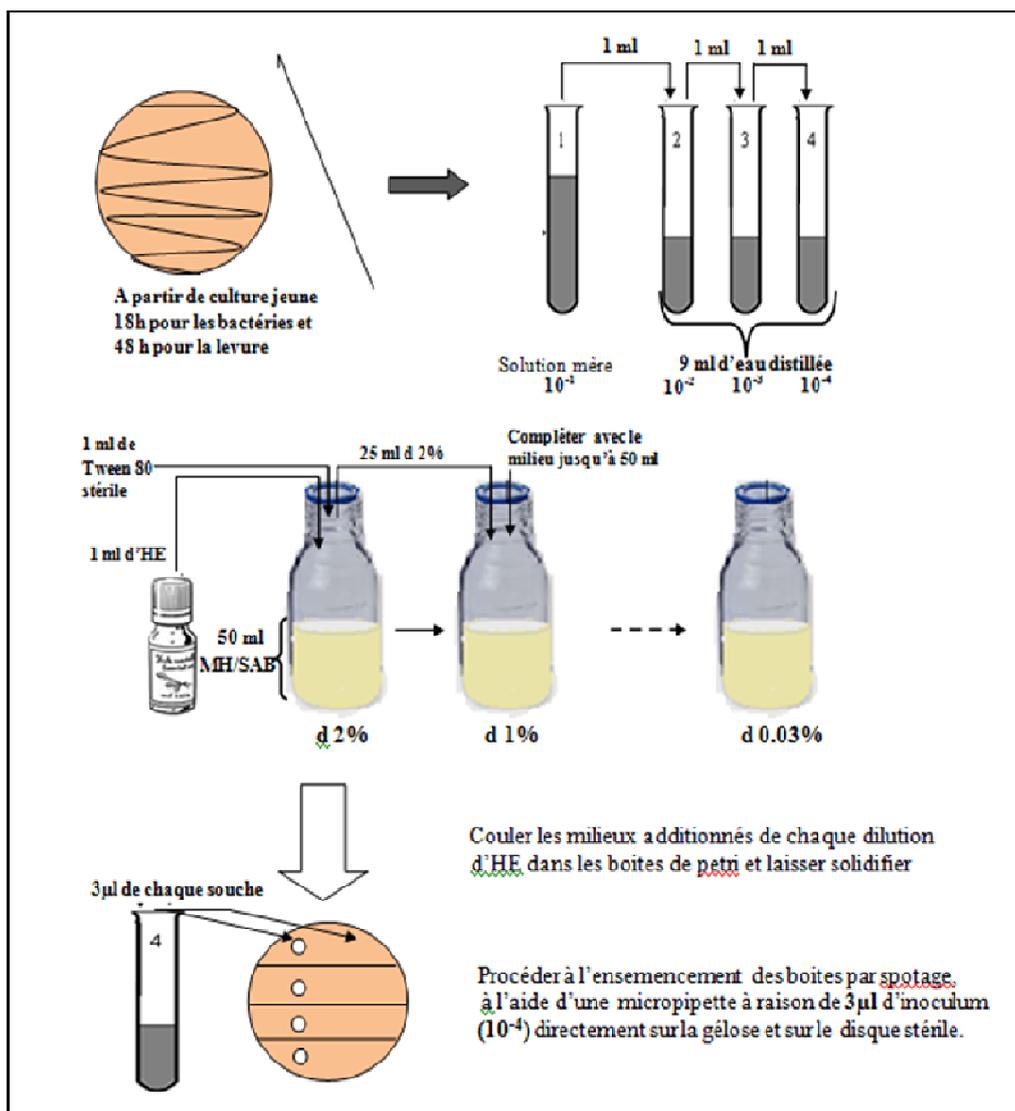


Figure 43: Méthode de détermination de la CMI en milieu solide.

3.1.1. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

3.1.1.1. Principe

Le caractère bactéricide des HE étudiées par la détermination de la CMB qui correspond à la concentration minimale en HE pour obtenir la destruction de 99,99% de l'inoculum initial (soit moins de 0.01% des survivants) en 24 heures pour les bactéries et 48h pour la levure.

Cependant, étant donné que la détermination de la CMB est peu courante, cette technique ne sera développée dans cette étude que pour deux des HE testées à savoir : *Salvia officinalis* et *Ruta montana*.

3.1.1.2. Protocole expérimentale

La détermination de la CMB se fait comme suit :

- A partir de la CMI déterminée pour les deux HE, on prélève les disquesensemencés qu'on va repiquer sur milieu TSA et/ou SAB en utilisant la même gamme de concentration utilisée pour l'évaluation de la CMI. (on dépose 2 disques par boîte)
- Incubation à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48h pour la levure.
- La lecture des résultats se fait à l'œil nu, en indiquant la plus faible concentration d'HE traduisant par l'absence toute croissance bactérienne visible.

N.B : la CMB \leq la CMI.

Pour chaque expérience, 3 répétitions ont été réalisées.

➤ **Chapitre 2 : *Résultats et discussions***

Résultats et discussion

1. Localisation des sites producteurs des huiles essentielles:

La structure des éléments anatomiques dans lesquels les huiles essentielles sont élaborées se rapporte à deux types : ou bien la substance sécrétée demeure à l'intérieur de l'élément qui l'a élaborée (cellules à essence) ou bien les substances élaborées par les cellules qui les bordent s'accumulent dans des méats (certaines poches ou canaux sécréteurs) (**Deysson, 1978**).

L'examen microscopique des coupes histologiques des plantes étudiées met en évidence les structures responsables de la synthèse, du stockage et de la sécrétion de ces substances.

1.1.Cas de *Juniperus phoenicea* L. et *Conyza canadensis* L.:

Les photos des coupes réalisées sur les parties aériennes (feuilles et fruits) de *Juniperus phoenicea* et des feuilles de *Conyza canadensis* L. révèlent la présence des canaux sécréteurs qui apparaissent comme des poches de faibles diamètres (figure 44 et 45) Ces observations sont en accord avec celles établies par (**Deysson, 1978**) sur les conifères.

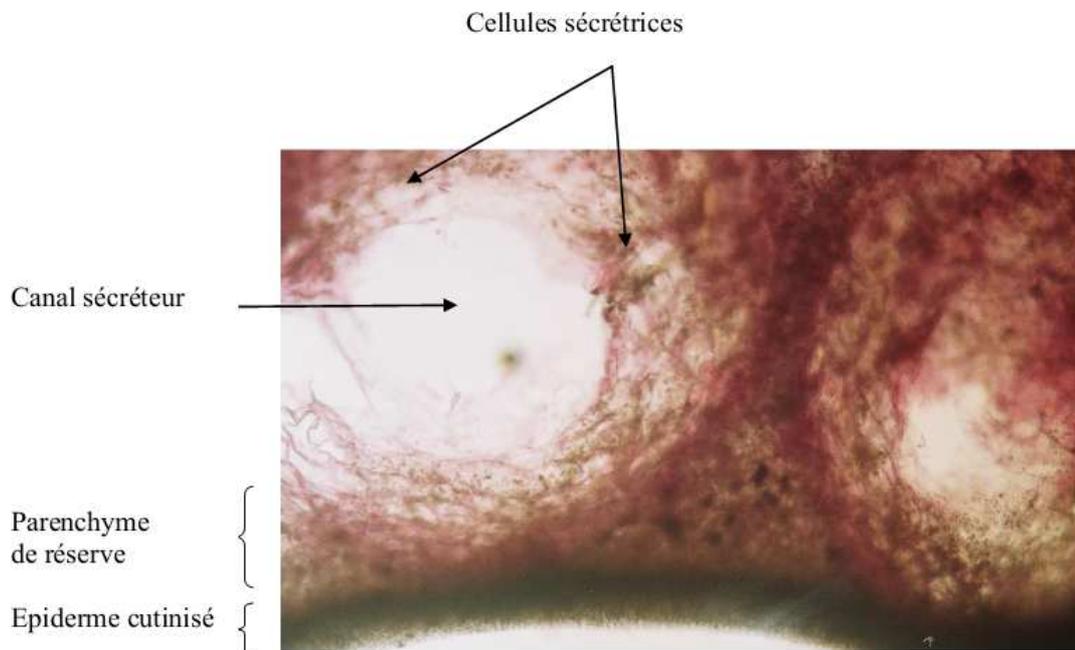


Figure 44: Coupe transversale du fruit de *Juniperus phoenicea* L. montrant la présence d'un canal sécréteur (Gr. : X 80).



Figure 45: Coupe transversale de la feuille de *Juniperus phoenicea* mettant en évidence la présence des canaux sécréteurs et des gouttelettes d'huile essentielle (Gr. : X160).

1.2.Cas du Fenouil commun et la Lavande:

- **Le fenouil commun:**

Les Apiaceae possèdent, dans tous leurs organes, des canaux sécréteurs de gomme, résine ou d'huile essentielle et certaines d'entre elles sont très aromatiques.

Les observations effectuées à partir des coupes histologiques des tiges et du fruit d'*Anethum graveolens* révèlent la présence de canaux sécréteurs (CS) tout autour des tiges et des feuilles comme l'illustrent les figures 46 et 47.

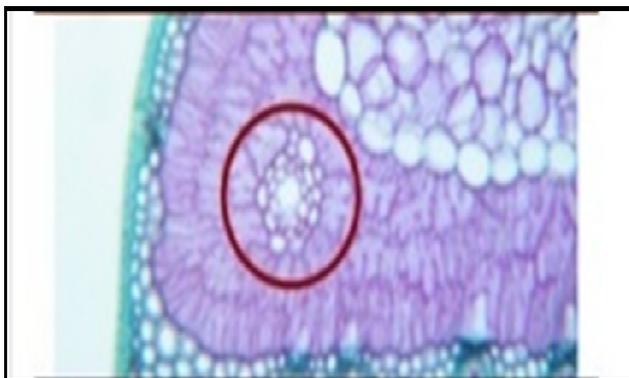


Figure 46: Coupe transversale du fruit d'*Anethum graveolens* montrant la présence d'un canal sécréteur (Gr. : 12.5 x 3.2).



Figure 47: Coupe transversale de la tige d'*Anethum graveolens* montrant la présence d'un canal sécréteur (CS) (Gr. : 25 x 3.2).

- **Lavande:**

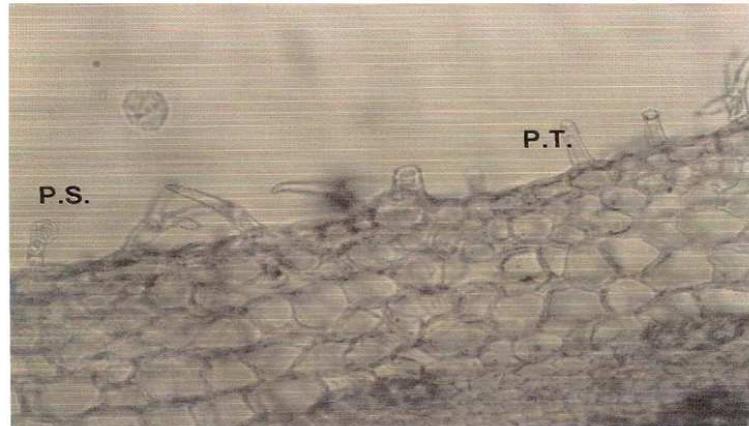


Figure 48: Coupe transversale de la tige de *L. stoechas* mettant en évidence les poils tecteurs (PT) et sécréteurs (PS) (Gr.: X 80).

Les photos des coupes réalisées sur les parties aériennes et de *Lavandula stoechas* (Figures 48, 49) 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 Novaka 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).

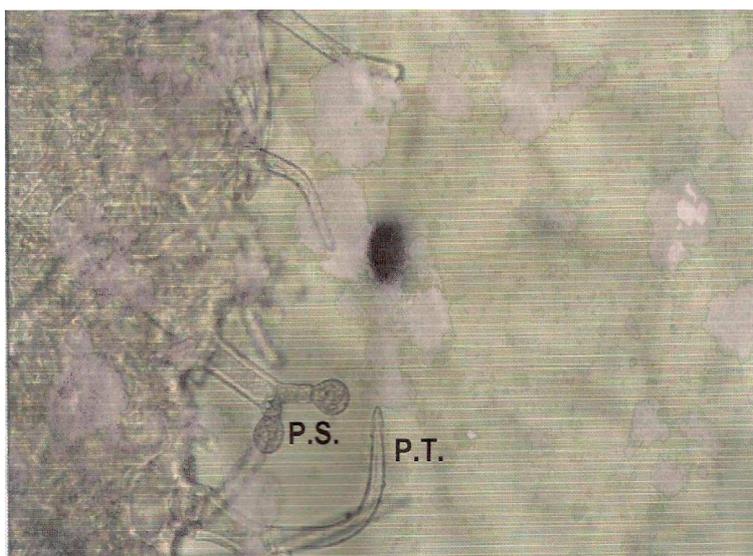


Figure 49: Coupe transversale d'une feuille de *L. stoechas* mettant en évidence les poils tecteurs (PT) et sécréteurs (PS) (Gr.: X 80).

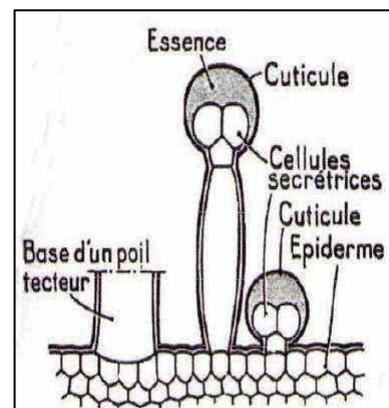


Figure 50: Schéma d'un poil tecteur et sécréteur (Camefort, 1972).

2. Rendements des extractions :

2.1.Cas des huiles essentielles :

Les rendements en huiles essentielles exprimés en ml pour 100 g de matière végétale des espèces étudiées (Tableau 13), diffèrent parfois énormément pour des échantillons d'une même espèce et de différentes provenances.

Tableau 13: Rendement des extractions des huiles essentielles des échantillons étudiés

Nom scientifique	Partie récoltée	Provenance	Rendement (ml/100g)
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	Feuilles	Sétif	0.39
	Fruits	Sétif	2.75
	Fruits	Sétif	2.75
<i>Anethum graveolens</i>	Fruits matures	Birkhadem	0.88
<i>Lavandula stoechas</i> L.	Feuilles+ Fleurs	Azzazga (Tizi-Ouzou)	0.16
<i>Conyza canadensis</i> L.	Feuilles	El-Harrach	0.76

2.1.1. Cas de *Juniperus phoenicea* L.:

➤ Extraction de l'huile essentielle des feuilles par hydrodistillation :

Le tableau 14 regroupe les rendements en huile essentielle extraite à partir des feuilles de quelques échantillons de *J. phoenicea* exprimés en ml par 100 g de matière végétale.

Tableau 14: Rendement en huile essentielle extraite à partir des feuilles de quelques échantillons de *Juniperus phoenicea*.

Espèce	Provenance	Rendement (ml/100g)
<i>Juniperus phoenicea</i>	Sétif ⁽¹⁾	0.39
	Epidavios, Grèce ⁽²⁾	0.21
	El Penon, Espagne ⁽³⁾	0.66
	Ouest de Setubal, Portugal ⁽⁴⁾	0.41
	Tarifa, Espagne ⁽⁵⁾	0.30

(1) : Echantillon étudié ; (2), (3), (4), (5) : (Adam et al., 1996)

On remarque que le rendement en huile essentielle de l'échantillon étudié (**0.39 ml/100g de matière sèche**) est moyen par rapport aux échantillons provenant d'autres pays. La variation du rendement d'extraction de l'huile essentielle des différents échantillons peut être due aux conditions climatiques et édaphiques qui diffèrent d'une région à une autre.

➤ Extraction de l'huile essentielle des fruits par hydrodistillation :

Les rendements en huiles essentielles obtenus par hydrodistillation des fruits de deux espèces de genévrier sont regroupés dans le tableau 15.

Le rendement obtenu par l'hydrodistillation des feuilles (**0.34 g/100g**) est très faible est par rapport à celui obtenu à partir des fruits (**2.75 g/100g**) du même échantillon de *Juniperus phoenicea*. On remarque que les fruits de *Juniperus phoenicea* donnent plus d'huile essentielle que ceux de *Juniperus communis*, ce qui confirme la variation du rendement en huile essentielle au sein du même genre botanique.

Tableau 15: Rendement de l'extraction de l'huile essentielle des fruits par hydrodistillation de quelques échantillons de *Juniperus phoenicea* exprimé en g/100 g de matière végétale.

Espèce	Provenance	Rendement (g/100g)
<i>Juniperus phoenicea</i>	Sétif ⁽¹⁾	2.75
<i>Juniperus communis</i>	Metohija, Serbie ⁽²⁾	1.15
<i>Juniperus communis</i>	Vilnius, Lituanie ⁽³⁾	0.90

(1) : Echantillon étudié; (2) : (Glisic *et al.*, 2007) ; (3): (Butkiené *et al.*, 2006)

➤ **Extraction de l'huile essentielle des fruits par hydrodistillation assistée par micro-ondes :**

Le tableau 16 montre le rendement en huile essentielle extraite à partir des fruits de *Juniperus phoenicea* par micro-ondes comparé à celui obtenu par hydrodistillation du même échantillon. Les rendements obtenus en utilisant les deux techniques sont comparables (**2.75 g/100g** pour HD et **2.71 g/100g** avec ESSAM). On constate que l'utilisation des micro-ondes pour l'extraction des huiles essentielles n'engendre pas de grosses pertes en terme de rendement d'extraction, de plus un gain de temps énorme est observé lors d'une extraction par micro-ondes (6 fois plus rapide que l'hydrodistillation).

Tableau 16: Rendement de l'extraction des huiles essentielles à partir des fruits de *Juniperus phoenicea* par HD et ESSAM exprimé en g/100g de matière végétale.

Espèce	Partie utilisée	Provenance	Technique d'extraction	Durée d'extraction (min)	Rendement (g/100g)
<i>Juniperus phoenicea</i>	Fruits	Sétif ⁽¹⁾	ESSAM	30	2.71
<i>Juniperus phoenicea</i>	Fruits	Sétif ⁽²⁾	HD	195	2.75

(1), (2): Echantillons étudiés. **HD:** Hydrodistillation; **ESSAM:** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes.

- **Cinétique d'extraction des huiles essentielles:**

L'étude de la cinétique d'extraction n'a pas pu être réalisée sur les feuilles de *J. phoenicea* de Sétif vue son faible rendement d'extraction (**0.39 ml/100g**). Dans le but d'étudier l'influence du procédé d'extraction sur la cinétique de l'extraction, on a suivi la quantité (volume) d'huile recueillie à partir des fruits en fonction du temps. La figure 51 représente l'évolution du rendement lors de l'extraction de l'huile essentielle des fruits de *Juniperus phoenicea* pour les deux techniques étudiées qui sont HD et ESSAM. La durée d'extraction est théoriquement le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'huile contenue dans la matière végétale. Or en pratique, il est difficile de récupérer toute l'huile. Ce temps correspond alors au moment à partir duquel on n'observe plus d'huile dans le distillat, il détermine la fin du processus.

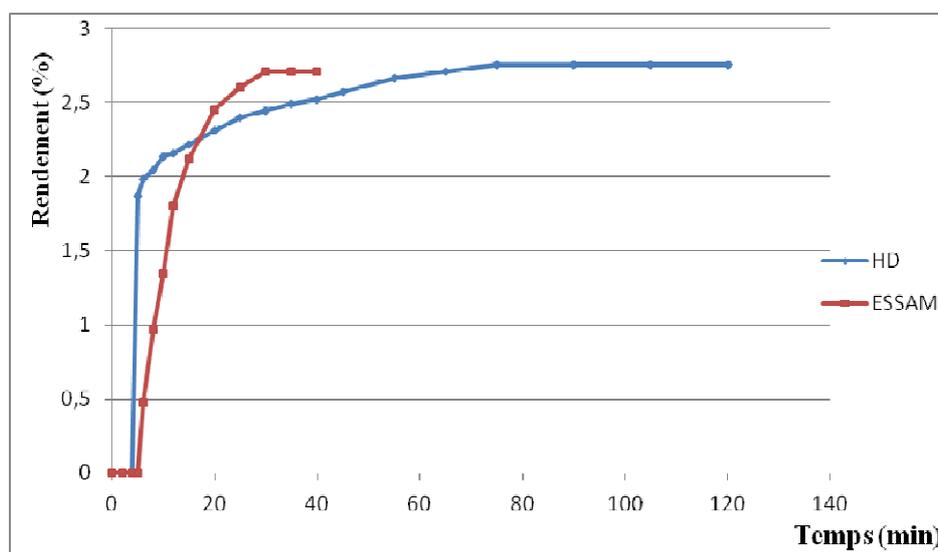


Figure 51: Cinétique d'extraction de l'HE des fruits de *J. phoenicea* par HD et ESSAM.

- **Mécanisme de l'extraction de l'huile essentielle:**

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quelque soit le mode d'extraction utilisé (**Lucchesi, 2005**), cela est explicité dans la figure 52.

Cette étude cinétique montre l'existence de trois étapes pour les deux techniques:

- L'étape de chauffage, traduit l'augmentation de la température au sein du réacteur jusqu'à la température de distillation sensiblement égale à la température d'ébullition de l'eau. Durant cette étape aucune extraction d'huile essentielle ne se produit.

- La seconde étape correspond à une extraction plus ou moins rapide de l'essence selon la technique d'extraction et la matrice traitée.
- Enfin, au cours de la troisième étape la courbe tend vers un second palier, qui correspond au rendement maximum possible d'être atteint dans les conditions expérimentales optimisées pour une matrice donnée.

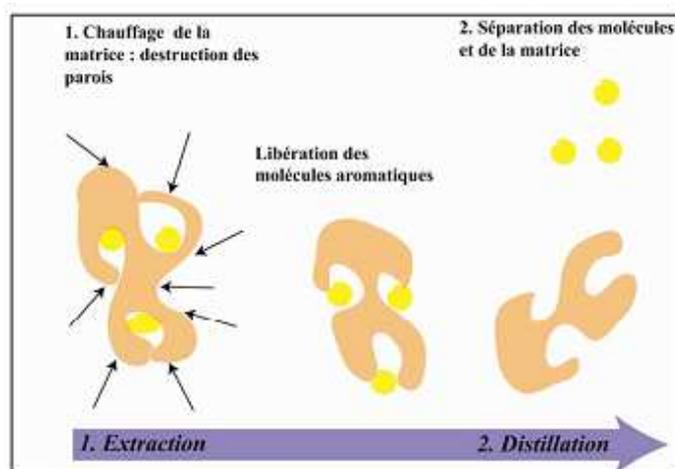


Figure 52: Etapes de l'obtention d'une huile essentielle (Lucchesi, 2005)

➤ **Cas de l'extraction par hydrodistillation :**

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 baies de *Juniperus phoenicea* et à leur broyage. Après le temps de chauffage, trois phases de distillation peuvent être révélées :

Phase 1 : (de 0 à 15 min) : durant cette phase le rendement en huile essentielle augmente rapidement permettant ainsi de récupérer **80.72%** de l'huile essentielle. Les baies du genévrier, renferment des canaux sécréteurs qui jouent le rôle de réservoirs à huile essentielle. Ces canaux ont été en partie détruits au cours du broyage, 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**).

Phase 2 : (de 15 à 75 min) : avec l'avancement du processus d'hydrodistillation, le rendement augmente lentement pour atteindre son maximum (**2.75 g/100g**) au **t= 75min**. Durant la deuxième phase, l'huile essentielle contenue dans les canaux sécréteurs (réservoirs)

non détruits diffuse vers la surface des particules végétales. Cette diffusion se fait lentement, ce qui explique la faible augmentation du rendement d'extraction durant cette phase.

Phase 3 : (de 75 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 le fruit.

➤ **Cas de l'extraction par micro ondes:**

Du fait des conditions opératoires initiales, la phase de chauffage est beaucoup plus courte pour l'extraction assistée par micro-ondes que pour l'hydrodistillation. La durée d'extraction par micro-onde est relativement courte puisqu'au bout de 30 minutes nous n'observons plus de distillat contenant des gouttelettes d'huile. Le rendement augmente rapidement durant les **20 premières minutes** où plus de **90.74%** de l'huile sont extraits puis nous avons une évolution plus lente. En conséquence, pour atteindre un même rendement en huile essentielle, il est nécessaire de chauffer la matière végétale seulement **30 minutes** en micro-onde et plus de **75 minutes** en HD. Pour expliquer les phénomènes intervenant lors d'une ESSAM au sein du matériel végétal, **Lucchesi (2005)** a signalé que les changements relevant de l'extraction assistée par micro-ondes sur la matière végétale après quelques minutes, sont spectaculaires. Ils montrent des parois cellulaires endommagées. Ceci confirme l'explosion signalée par **Paré et Bélanger (2003)**, produite au niveau de la paroi cellulaire consécutive à l'augmentation soudaine de la température, ce qui entraîne un épuisement rapide de l'huile essentielle. Par ailleurs, la micrographie de l'hydrodistillation signale que quelques parois cellulaires sont toujours uniformes et que leurs contenus sont toujours intacts.

2.1.2. Cas de *Lavandula steochas*:

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.

2.1.3. Cas d'*Anethum graveolens*

Les fruits récoltés au début d'Août (2011) de la région de Birkhadem à Alger, ont fourni un rendement en huile essentielle de 0,88 par 100g de matière végétale. Le rendement obtenu est inférieur à celui enregistré par **Vokk et al., 2011** qui ont travaillé sur la même espèce en Estonie où ils ont remarqué un rendement en HE des feuilles d'*Anethum graveolens* de **0,65%** (en été) et **0,56%** (en hiver), alors que la teneur en HE extraite à partir de la graine est nettement supérieure (**3,5%**). La teneur en HE produite par la graine est beaucoup plus importante que celle obtenue à partir des aux feuilles d'aneth (**Callan et al., 2007**). **Radulescu et al., 2010** qui ont travaillé sur les parties aériennes d'*Anethum graveolens* ont mentionné les rendements cités dans le tableau 17.

Tableau 17: Rendements d'extraction en HE d'*Anethum graveolens* (**Radulescu et al., 2010**).

Rendements		
Feuilles	Fleurs	Fruits
1,2%	3,2%	3,4%

Babri et al., 2012, ont mentionné un rendement en HE d'aneth issue des graines (**1,45%**) nettement supérieur à celui obtenu dans le cas de notre huile. Les conditions édapho-climatiques, la période de récolte (floraison ou état végétatif) ainsi que les conditions d'entreposage sont à priori considérées comme responsables des variations des rendements en huile essentielle.

2.2. Rendements en extrait éthanolique:

Les extraits éthanoliques récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant, ces extraits renferment les composés phénoliques et les flavonoïdes.

2.2.1. *Juniperus phoenicea*:

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 flavonoïdes et les composés

phénoliques. Le rendement a été exprimé en g pour 100g de matière végétale et est représenté dans le tableau 18.

On constate que le rendement d'extraction obtenu à partir des feuilles de *Juniperus phoenicea* est supérieur à celui obtenu à partir des fruits de la même espèce. 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. La variation des rendements est attribuée à la polarité des différents composés présents dans la feuille. Les rendements les plus élevés ont été obtenus en utilisant des solvants polaires (Jayaprakasha et al., 2001).

Tableau 18: Rendement d'extraction à partir des feuilles et des fruits de deux échantillons de *Juniperus phoenicea* de Sétif

Espèce	Partie utilisée	Provenance	Taux d'extraction en g/100g
<i>Juniperus phoenicea</i>	Feuilles	Sétif ⁽¹⁾	60
<i>Juniperus phoenicea</i>	Fruits	Thala, Tunisie ⁽²⁾	21

(1) : Echantillon étudié ; (2) : (Hayouni et al., 2007)

2.2.2. *Lavandula stoechas*:

D'après le tableau 19, 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.

Tableau 19: Rendement en extrait sec de deux échantillons de *Lavandula stoechas*

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

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

2.2.3. *Anethum graveolens*:

Le rendement moyen en extrait a été calculé à partir des graines sèches du fenouil amer (*Anethum graveolens*) récoltées le mois d'août de l'année 2011 à la région de Birkhadem (Alger); extraites par Soxhlet à l'aide de l'éthanol. L'échantillon a fourni un taux d'environ 14.57% conforme aux données de la littérature. Ce rendement est plus élevé que celui obtenu à partir des graines de *F. vulgare* de la région de Gasteiz en Espagne (13%), mais il est loin derrière le rendement des graines de la même plante, extraite par le même solvant (éthanol) récoltée en Turquie (16.2%) et au Brésil avec des taux de 16% et 16.8% obtenue pour deux échantillons différents (Tableau 20).

Tableau 20: Rendements en % (v/100g de MV), en extrait éthanolique des graines de *Anethum graveolens* dans cinq pays.

Région	Algérie (Birkhadem) ¹	Espagne (Gasteiz) ²	Brésil (1) ³	Turquie ⁴	Brésil (2) ⁵
Rendements (%)	14.57	13	16	16.2	16.8

¹ Notre échantillon récolté en 2011 ; ² Guillén et al., 1996 ; ³ Moura et al., 2005 ; ⁴ Oktay et al., 2003 ; ⁵ Leal et al., 2011.

- **Influence de la méthode d'obtention de l'extrait**

Pour mettre l'accent sur l'influence du procédé d'extraction sur le rendement on a comparé les résultats de notre extrait éthanolique à ceux obtenus en utilisant d'autres méthodes d'extraction. L'extraction à l'**éthanol** semble la plus efficace avec un rendement de **16.20%** pour un échantillon récolté en **Turquie** et **14.57 %** pour notre échantillon récolté dans la région d'**El Harrach** ; ces deux valeurs sont largement supérieures par rapport à celle dont l'extraction est faite à l'**eau (10.95%)** (Tableau 21). Toutefois le rendement en **extrait aqueux** est relativement important comparativement à celui obtenu en faisant l'extraction par **hydrodistillation** qui a donné une valeur faible (**2.4%**) (Moura et al., 2005). Marwan et al. (2009) ont constaté qu'une même plante provenant du Pakistan a fourni un rendement de **15.63%** lorsque l'extraction est faite à l'éthanol qui est largement supérieur au rendement

obtenu par l'extraction au méthanol (**6,21%**). Ces résultats confirment l'effet significatif du procédé d'extraction sur le rendement en extrait.

Tableau 21: Rendement des différents procédés d'extraction.

Procédé d'extraction	Ethanol ¹	Ethanol ²	Eau ²	Hydrodistillation ³	Ethanol ⁴	Methanol ⁴
Rendements (%)	14.57	16.2	10.95	2.4	15.63	6.21

¹Notre échantillon (2011), ² Oktay et al., 2003 ; ³ Moura et al., 2005 ; ⁴Marwan et al., 2009

- **Influence de la l'organe utilisé :**

En les comparants aux autres parties de la plante, **les graines** fournissent le plus faible rendement (**14.57%**). Le rendement le plus élevé est celui donné par **les feuilles** à **40.64%** (Tableau 22) avec un grand écart par rapport à **la tige** qui a donné **29%** et à **l'inflorescence** avec environ **20.38%**.

Tableau 22: Le rendement des différentes parties d'*Anethum graveolens*.

Partie de la plante	Les graines ¹	L'inflorescence ²	La tige ²	Les feuilles ²
Rendements en (%)	14.57	20.38	29.68	40.64

¹Notre échantillon, 2011 ; ² Barros et al., 2001

3. Caractérisation chimique des huiles essentielles et extraits :

3.1. Analyse chimique des extraits végétaux:

L'étude quantitative des extraits bruts éthanoliques au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols et des flavonoïdes. Dans ce but, deux courbes d'étalonnage ont été tracées dont l'une réalisée avec **l'acide gallique** et l'autre avec la **quercétine**. 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 : $y = a x + b$.

3.1.1. Les phénols totaux:

La valeur moyenne de la concentration 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 représentée par la figure 53.

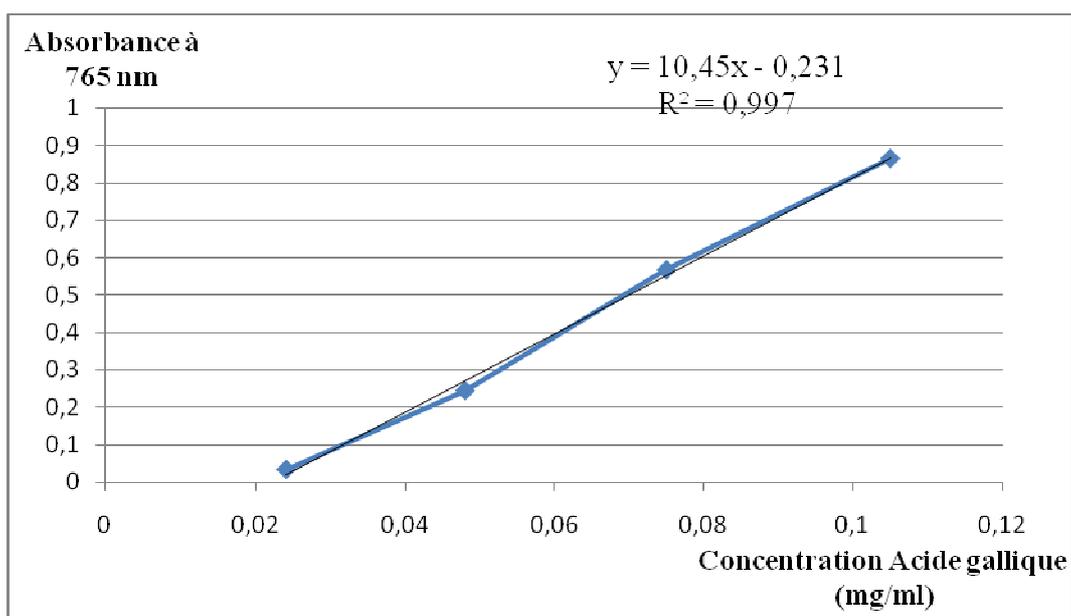


Figure 53: Courbe d'étalonnage des phénols totaux.

➤ Extrait des feuilles de *J. phoenicea*

Le tableau 23 montre la teneur en composés phénoliques de l'**extrait des feuilles** de *J. phoenicea* comparée à celle d'un **extrait des fruits** provenant de la Tunisie.

Tableau 23: Teneur en polyphénols de deux échantillon de *Juniperus phoenicea*

Espèce	Partie utilisée	Provenance	Teneur en phénols totaux (g équivalent acide gallique/g d'extrait sec)
<i>Juniperus phoenicea</i>	Feuilles	Sétif ⁽¹⁾	0.308
<i>Juniperus phoenicea</i>	Fruits	Thala, Tunisie ⁽²⁾	0.143

(1) : Echantillon étudié ; (2) : (Hayouni E.A. et al., 2007)

On remarque que la teneur en polyphénols de l'extrait des feuilles de *J. phoenicea* est supérieure à celle obtenue à partir du fruit de la même espèce. Ainsi cette teneur élevée en composés phénoliques devra en principe conférer à notre extrait une forte activité antioxydante. Selon **Hayouni (2003)**, la teneur en polyphénols d'un extrait dépend de la méthode d'extraction utilisée, de la nature du solvant et du matériel végétal. Ainsi, l'utilisation des solvants polaires donne une teneur élevée en composés phénoliques.

➤ **Extrait des graines de *d'Anethum graveolens***

Les résultats du dosage des phénols totaux de l'extrait des graines de fenouil amer *Anethum graveolens* étudié sont représentés dans le tableau 24.

Tableau 24: Comparaison de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait étudié avec celui obtenu par d'autres études.

Echantillon	(Birkhadem) ¹	(Turquie) ²	(Egypte) ³
Teneur en phénols totaux (mg Eq AG/g d'extrait)	82,72	90	146,51

¹Echantillon étudié; ² Okay et al., 2010; ³ Vidua-Martos, et al., 2011

➤ **Extrait de *L. stoechas* :**

Le tableau 25 résume les résultats du dosage des phénols totaux des extraits de différentes espèces du genre *Lavandula*.

Tableau 25: 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 ⁽¹⁾	132,3
<i>L. vera</i>	Bulgarie ⁽²⁾	85,6
<i>L. dentata</i>	Maroc ⁽³⁾	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**).

3.1.2. Les flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes a été estimée par une méthode spectrophotométrique en utilisant la courbe d'étalonnage donnée par la figure 54:

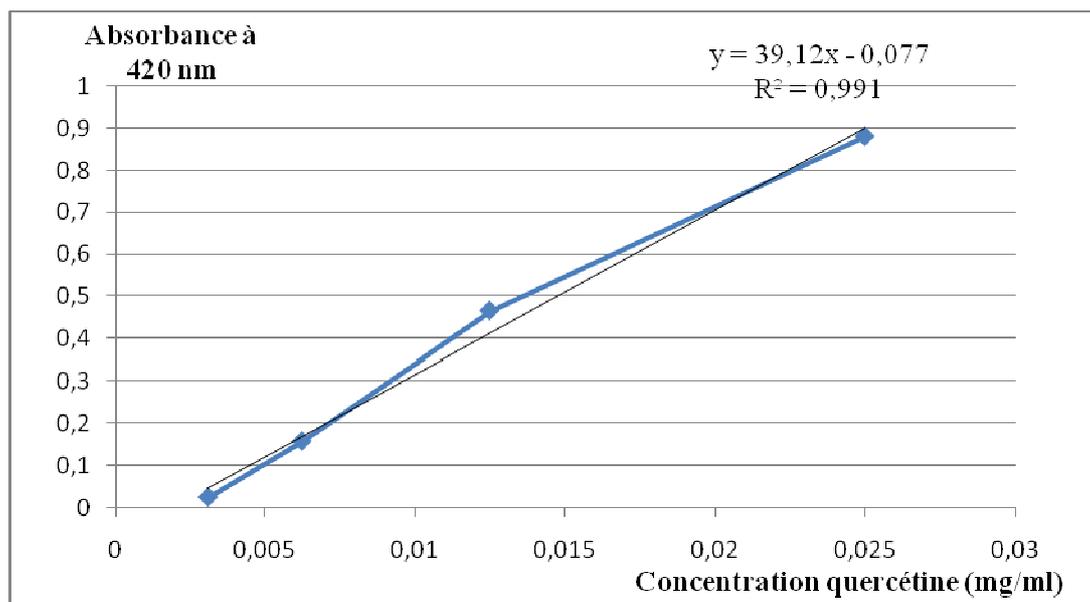


Figure 54: Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

➤ Extrait de feuilles de *Juniperus phoenicea*

Concernant la teneur en flavonoïdes, le résultat est de **0.02g équivalent quercétine/g d'extrait sec**. Au vu de sa teneur élevée en flavonoïdes, l'extrait éthanolique de notre plante devrait présenter un très bon pouvoir antioxydant étant donné que les flavonoïdes d'origine naturelle sont des capteurs puissants de radicaux (**Bartošíková et al., 2003 ; Heilerová et al., 2003 ; Lahouel et Fillastre, 2004; Panichayupakaranant et Kaewsuwan, 2004 ; Panovska et al., 2005**).

➤ Extrait de graines d'*Anethum graveolens*

Les flavonoïdes sont considérés comme une sous classe des composés phénoliques, il est par conséquent logique que la teneur en phénols totaux de l'extrait (**82,72±2,857 mg Eq Q/g d'extrait**) soit directement reliée à sa teneur en flavonoïdes (**37,268±5,690 mg Eq Q/gd'extrait**). Cette dernière constitue environ **45%** de la teneur en phénols totaux.

Les résultats du dosage des flavonoïdes de notre échantillon sont appréciables par rapport aux teneurs des extraits, de la même plante, obtenus à partir de divers études ; ce qui permet de constater que notre extrait se particularise par la plus forte teneur en flavonoïdes. (**37,268±5,690 mg Eq Q/g d'extrait**) suivi par celui provenant de Pakistan (**24,11±6,82 mg Eq Q/g d'extrait**) (Anwar et al., 2009) et l'extrait de la Chine (**12.3 ± 0.18 mg Eq Q/g d'extrait**) (He et al., 2011).

➤ **Extrait de *L. stoechas* :**

Les résultats du dosage des flavonoïdes des extraits de deux échantillons de lavande sont illustrés dans le tableau 26:

Tableau 26: Teneurs en flavonoïdes de deux échantillons de lavande:

Espèces	Provenance	Teneur en flavonoïdes mg eq quer/ g
<i>L. stoechas</i>	Tizi-Ouzou ⁽¹⁾	41,58
<i>L. dentata</i>	Maroc ⁽²⁾	15,3

(1) : Echantillon étudié ; (2) : (Imelouane et al., 2009).

L'extrait de *L. stoechas* étudié 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.

3.2. Composition chimique des huiles essentielles:

3.2.1. Huiles essentielles de *J. phoenicea*:

➤ Huiles essentielle des feuilles de *J. phoenicea*

Tableau 27: Composition chimique de l'HE des feuilles de *J. phoenicea* de Sétif

N°	Composés	IK	%	Identification*
1	Tricyclène	1018	0.2	a, b, c, d, e
2	α -Pinène	1032	45.8	E, a, b, c, d, e
3	Camphène	1076	0.3	E, a, b, c, d, e
4	β -Pinène	1124	0.7	E, a, b, c, d, e
5	Sabinène	1132	0.1	a, b, c, d, e
6	δ -3-Carène	1159	3.9	E, a, b
7	β -Myrcène	1174	0.6	a, b, c, d, e
8	α -Phellandrène	1177	0.1	a, b, c
9	α -Terpinène	1188	0.2	E, c, d, e
10	Limonène	1206	0.6	E, d, e
11	β -Phellandrène	1218	1.0	a, b, c, d, e
12	γ -Terpinène	1260	0.1	E, a, b, c, d, e
13	Terpinolène	1290	0.3	E, a, b, c, d, e
14	Octanal	1296	0.1	b, c, d
15	trans-Sabinène Hydrate	1474	0.3	a, b, c, d, e
16	α -Copaène	1497	0.1	b, c, d
17	Decanal	1506	0.2	E, a, c
18	β -Bourbonène	1535	0.2	a, b, d, e
19	α -Gurjunène	1544	0.3	b, c, d, e
20	Linalool	1553	0.1	E, a, b, c, d, e
21	Linalyl acetate	1569	0.4	c, d
22	β -Elemène	1600	0.2	a, e, c
23	Terpinène 4-ol	1611	0.1	E, a, b, c, d, e
24	β -Caryophyllène	1617	1.3	a, b, c, d, e
25	allo-Aromadendrène	1663	0.5	b, c, d
26	(Z)- β -Farnesène	1668	0.6	b, c, d, e

27	α -Humulène	1687	0.9	a, b, c, d, e
28	α -Terpineol	1707	0.6	E, a, b, c, d, e
29	Borneol	1719	0.2	a, b, c
30	Germacrène D	1728	1.9	a, b, c, d, e
31	β -Bisabolène	1741	1.0	a, b, c, d, e
32	Bicyclogermacrène	1755	0.7	b, c, e
33	δ -Cadinène	1772	0.1	a, b, c, d, e
34	γ -Cadinène	1776	0.1	a, c, d, e
35	α -Bisabolène	1784	2.4	c, d, e
36	Géranyl acétone	1840	0.6	c, e
37	Germacrène B	1864	0.2	b, c, d, e
38	p-Cymène-8-ol	1864	1.1	a, b, c, d, e
39	Caryophyllène oxyde	1990	0.2	a, b, c, d, e
40	(E) –Nerolidol	2050	2.6	E, a, e
41	Elemol	2089	0.3	a, b, d
42	Globulol	2098	0.7	a, c, d
43	Thymol	2198	0.6	E, a, b, c
44	Spathulénol	2144	1.1	a, b, c, d, e
45	α -cadinol	2256	0.5	a, c, d
	Composés identifiés (%)		74.1	
	Monoterpènes		53.9	
	Monoterpènes oxygénés		4	
	Sesquiterpènes		10.5	
	Sesquiterpènes oxygénés		5.4	
	Autres		0.3	

E: Comparaison des indices de rétention des composés à ceux des étalons; **a:** (Jennings et Shibamoto,1980); **b:** (Baser et *al.*, 2005); **c:** (Tabanca et *al.*, May/Jun 2004); **d:** (Tabanca et *al.*, March/April 2004); **e:** (El-Olemy et *al.* 2005).

L'analyse par CPG de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles de *Juniperus phoenicea* a permis d'identifier 45 composés qui représentent **74.1%** de la totalité des pics. Nous remarquons que cette huile présente une dominance des **hydrocarbures monoterpéniques** qui constituent **53.9%** avec les **sesquiterpènes** qui constituent **10.5%** des composés de l'huile. L'huile essentielle des feuilles de *Juniperus phoenicea* possède comme composé majoritaire **l' α -pinène**. Ce composé majoritaire présente plusieurs activités biologiques: il est antibactérien, anti-inflammatoire, antiviral, expectorant, sédatif, herbicide, insectifuge, aromatisant (**Duke, 1998**). On note aussi une bonne teneur en composés oxygénés (**9.4%**), avec (**E**)–**Nerolidol** qui est un sesquiterpène oxygéné et constitue un composé majoritaire de cette huile (**2.6%**).

δ -3-Carène (**3.9%**), α -Bisabolène (**2.4%**) et Germacrène D (**1.9%**); constituent les 3 autres composés dominants de la composition de l'huile essentielle des feuilles de *Juniperus phoenicea*.

A titre de comparaison, le tableau 28 donne les teneurs en composés majoritaires de quelques échantillons de *Juniperus phoenicea*. D'après les résultats résumés dans le tableau ci-dessous, on remarque que **l' α -pinène** reste toujours le principal composé majoritaire de l'huile essentielle des feuilles de *Juniperus phoenicea* quelque soit sa provenance. La teneur en ce composé de l'huile de notre échantillon est comparable à celles des échantillons provenant d'autre pays méditerranéens. On peut enregistrer aussi la présence du **α -bisabolène** et du (**E**)- **Nerolidol** comme des composés majoritaires dans l'huile de notre échantillon, avec des teneurs de 2.4% et 2.6% respectivement.

Ces composés sont quasiment absents pour les autres échantillons. Les teneurs en **β -pinène** (0.7%), en **β -myrcène** (0.6%) et en **α -Terpinéol** (0.6%) sont très faibles comparées à celles enregistrées dans le cas des échantillons des autres pays. Pour le **δ -3-carène** qui est un composé majoritaire de l'huile de notre échantillon (3.9%), sa teneur reste très faible par rapport, à sa teneur dans l'huile du Maroc. La teneur en **Germacrène D** (**1.9%**) est comparable à celle de l'huile essentielle du Maroc (**2%**) mais reste élevée par rapport à celles des huiles de la Grèce et de l'Espagne.

Tableau 28: Comparaison entre les teneurs (%) des composés majoritaires des huiles essentielles extraites par hydrodistillation à partir des feuilles de *J. phoenicea*.

Composés majoritaires	Provenance			
	Echantillon étudié	Grèce ⁽¹⁾	Espagne ⁽²⁾	Maroc ⁽³⁾
α -pinène	45,8	41,8	53,5	45,5
β -pinène	0,7	1,3	2,5	-
δ -3-carène	3,9	-	1,7	13
α -bisabolène	2,4	-	-	-
Germacrène D	1,9	0,8	0,4	2
(E)-Nerolidol	2,6	-	-	-
β -myrcène	0,6	4,5	4	2,9
α -Terpinéol	0,6	0,8	2,5	-

(1) ;(2) ;(3) : (Adam et al., 1996). - : (<0.1%)

➤ **Variabilité de la composition chimique des HE de *J. phoenicea* en fonction de la méthode d'extraction:**

L'analyse chromatographique par CPG des huiles essentielles extraites à partir des fruits de *J. phoenicea* par HD et par ESSAM (figures 55 et 56) nous a permis d'obtenir les résultats de l'identification qui sont représentés dans le tableau 29.

Ce sont au total 43 molécules différentes qui ont été identifiées lors de l'étude des deux huiles essentielles obtenues en utilisant les deux techniques d'extraction ESSAM et HD. Pour les deux huiles essentielles, le composé majoritaire demeure l' α -pinène **73.4%** avec HD et **50.5%** avec ESSAM. La teneur en α -terpinéol et en β -myrcène s'accroît significativement en passant de **0.1%** et **0.7%** pour l'huile extraite par HD à **2.3%** et **1.7%** pour celle extraite par ESSAM respectivement. L'huile essentielle obtenue par ESSAM est nettement plus riche en composés oxygénés comparée à celle obtenue par hydrodistillation (**8.5% pour ESSAM et 1.8% avec HD**). Cette différence est intéressante dans la mesure où ces composés oxygénés sont nettement plus valorisables d'un point de vue aromatique et olfactif.

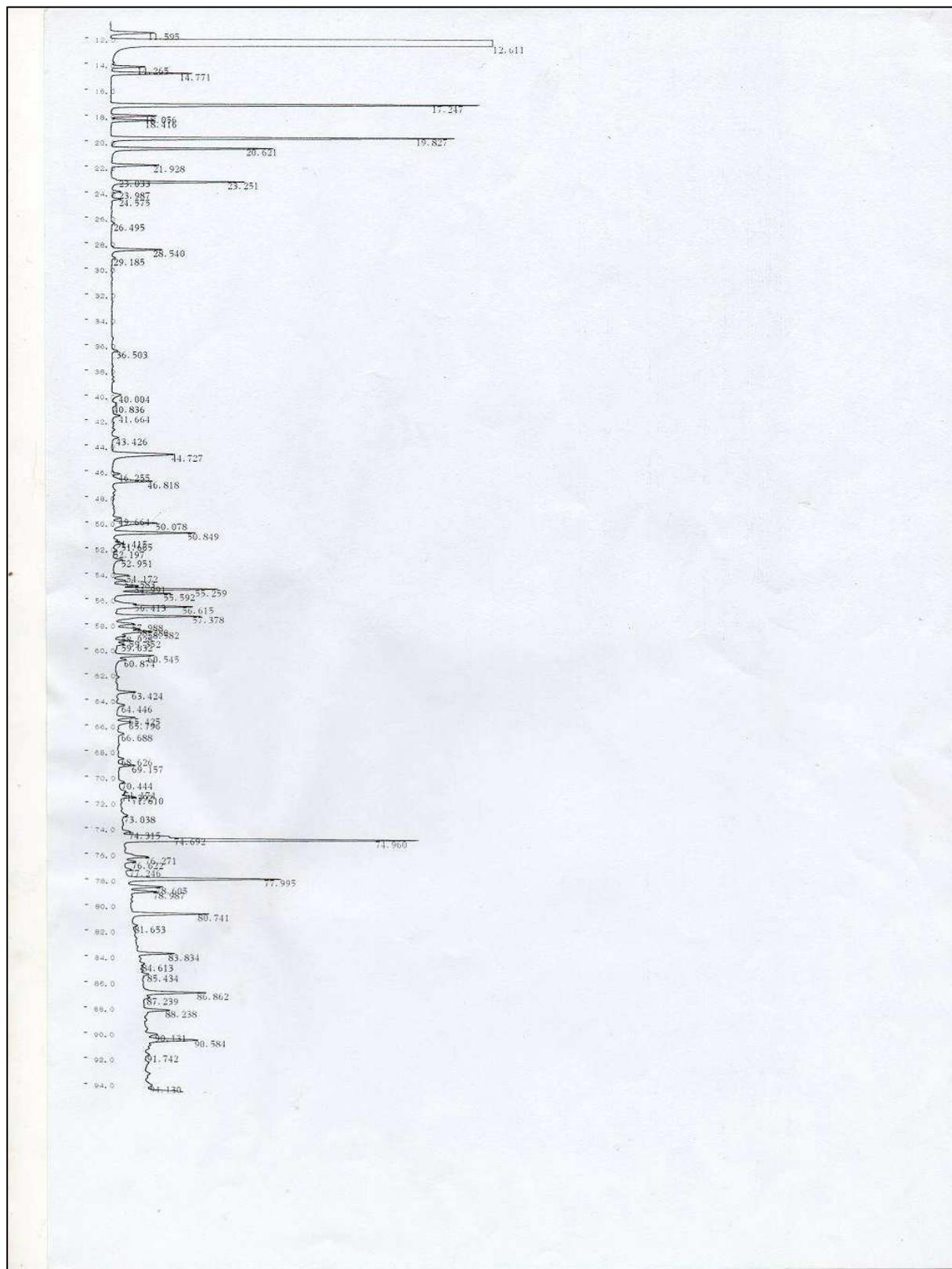


Figure 55: Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir des fruits de *Juniperus phoenicea* par HD

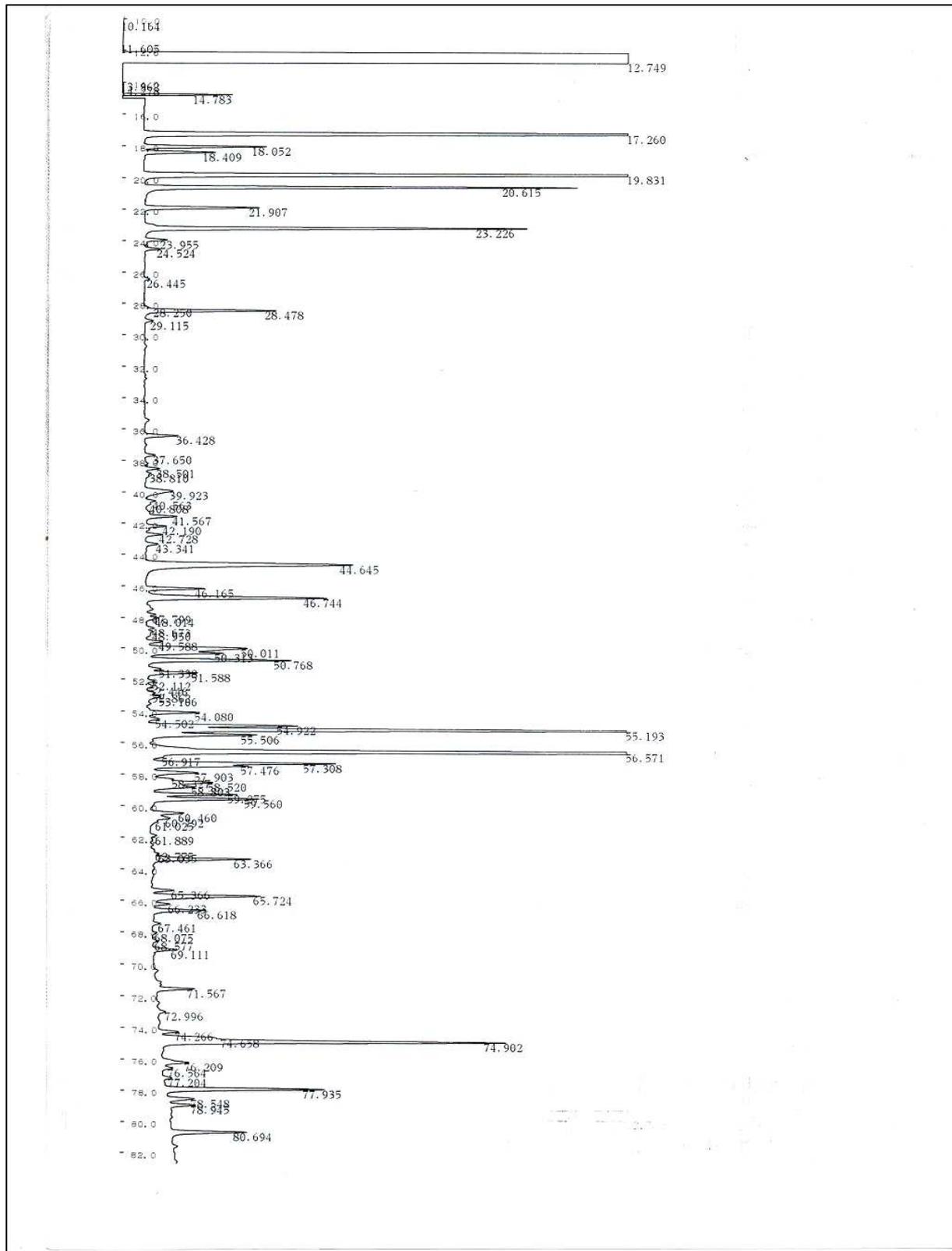


Figure 56: Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir des fruits de *Juniperus phoenicea* par ESSAM

Tableau 29: Composition chimique de l'huile essentielle extraite à partir des fruits de *Juniperus phoenicea* par HD et par ESSAM.

N°	Composés	IK	HD %	ESSAM	Identification
1	Tricyclène	1018	0.2	0.2	a, b, c, d, e
2	α -Pinène	1032	73.4	50.5	E, a, b, c, d, e
3	Camphène	1076	0.3	0.2	E, a, b, c, d, e
4	β -Pinène	1124	1.5	1.6	E, a, b, c, d, e
5	Sabinène	1132	0.2	0.5	a, b, c, d, e
6	δ -3-Carène	1159	1.4	1.6	E, a, b
7	β -Myrcène	1174	0.7	1.7	a, b, c, d, e
8	α -Terpinène	1188	0.2	0.6	E, c, d, e
9	Limonène	1206	0.6	1.2	E, d, e
10	β -Phellandrène	1218	0.1	0.4	a, b, c, d, e
11	γ -Terpinène	1260	t	0.3	E, a, b, c, d, e
12	Terpinolène	1290	0.2	0.6	E, a, b, c, d, e
13	Octanal	1296	t	0.3	b, c, d
14	Nonanal	1385	t	0.4	b, c, d, e
15	1-Octen-3-Ol	1452	0.1	0.7	d, e
16	trans-Sabinene Hydrate	1474	0.1	0.3	a, b, c, d, e
17	α -Copaène	1497	-	0.4	b, c, d
18	Decanal	1506	t	0.5	E, a, c
19	α -Gurjunène	1544	0.3	1.0	b, c, d, e
20	Linalyl acétate	1569	-	0.2	c, d
21	Pinocarvone	1586	-	0.2	b, c, d
22	β -Elemène	1600	0.3	0.6	a, e, c

23	Terpinène-4-ol	1611	0.5	0.4	E, a, b, c, d, e
24	β -Caryophyllène	1617	t	0.8	a, b, c, d, e
25	allo-Aromadendrène	1663	0.1	0.3	b, c, d
26	(Z)- β -Farnesène	1668	0.1	0.4	b, c, d, e
27	α -Humulène	1687	0.3	0.6	a, b, c, d, e
28	α -Terpineol	1707	0.1	2.3	E, a, b, c, d, e
29	Borneol	1719	0.4	T	a, b, c
30	Germacrène D	1728	0.5	0.4	a, b, c, d, e
31	β -Bisabolène	1741	0.1	0.2	a, b, c, d, e
32	Bicyclogermacrène	1755	0.3	0.4	b, c, e
33	δ -Cadinène	1772	0.1	0.6	a, b, c, d, e
34	α -Bisabolène	1784	0.3	0.4	c, d, e
35	Géranyl acétone	1840	0.1	-	c, e
36	Germacrène B	1864	0.1	0.4	a, b, c, d
37	p-Cymène-8-ol	1864	0.2	-	b, c, d, e
38	Palustrol	1953	0.1	-	a, b, c, d, e
39	Caryophyllène oxyde	1990	0.2	0.4	a, b, c, d, e
40	(E) –Nerolidol	2050	0.4	0.6	E, a, e
41	Globulol	2098	0.5	0.6	a, c, d
42	Thymol	2198	0.3	-	E, a, b, c
43	Spathuléol	2144	0.9	0.4	a, b, c, d, e
	Composés identifiés (%)		85.2	75.9	
	Monoterpènes		78.8	59	
	Monoterpènes oxygénés		1.7	6.5	
	Sesquiterpènes		2.5	6.1	
	Sesquiterpènes oxygénés		0.1	2	

	Autres		t	1,9	
--	---------------	--	---	-----	--

t : traces (concentration <0.1%) ; - : Non identifié

E: Comparaison des indices de rétention des composés à ceux des étalons ; a: (Jennings et Shibamoto,1980); b: (Baser et al., 2005); c: (Tabanca et al., May/Jun 2004); d: (Tabanca et al., March/April 2004); e: (El-Olemy et al. 2005).

Les résultats du tableau 30 montrent une variabilité dans la composition chimique des huiles essentielles obtenues à partir du même échantillon en passant d'un organe à un autre ou en changeant la technique d'extraction. Le composé majoritaire principal de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* reste toujours l' **α -pinène** qui est présent en quantité moindre dans l'huile essentielle des feuilles (**45,8%**) par rapport à celles des fruits (**73,4%** par HD et **50,5%** par ESSAM).

L'huile essentielle des feuilles présente des teneurs élevées en **δ -3-carène (3.9%)**, **α -bisabolène (2.4%)**, **Germacrène D (1.9%)** et en **(E)- Nerolidol (2.6%)** tandis que celles obtenues à partir des fruits du même échantillon sont plus riches en **β -pinène (1.5%** par HD et **1.69%** par ESSAM) comparées à celle obtenue à partir des feuilles (**0.7%**). L'huile essentielle des fruits obtenue par hydrodistillation classique (HD) possède la fraction oxygénée la plus faible (**1.8%**) par rapport aux autres huiles essentielles étudiées (**8.5%** pour l'huile essentielle obtenue à partir des fruits par ESSAM et **9.4%** pour l'huile essentielle des feuilles).

Tableau 30: Teneurs des principaux composés des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea*.

Composé	Huiles essentielles		
	Fe	Fr HD	Fr ESSAM
α-pinène	45,8	73,4	50,5
β-pinène	0,7	1,5	1,6
δ-3-carène	3,9	1,4	1,6
α-bisabolène	2,4	0,3	0,4
Germacrène D	1,9	0,5	0,4
(E)- Nerolidol	2,6	0,4	0,6
β-myrcène	0,6	0,7	1,7
α-Terpinéol	0,6	0,1	2,3

3.2.2. Composition chimique de l'HE de *Lavandula stoechas* L.:**Tableau 31:** Composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de *L. stoechas*

N°	Composés ¹	IK ²	%	Identification ³
1	Toluène	756	0,2	SM-IR
2	Tricyclène	919	0,6	SM-IR
3	α -Pinène	926	2,8	SM-IR
4	Camphène	957	2,5	SM-IR
5	t- Butylbenzene	962	0,9	SM-IR
6	δ -3-Carène	1017	3,3	SM-IR
7	p- Cymène	1025	1,2	SM-IR
8	1,8 - Cinéole	1028	4,9	SM-IR
9	γ -Terpinène	1058	0,25	SM-IR
10	Fenchone	1075	11	SM-IR
11	Fenchol	1106	1,3	SM-IR
12	Camphor	1122	6,85	SM-IR
13	Borneol	1180	1	SM-IR
14	Terpinène 4-ol	1182	0,55	SM-IR
15	p-Cymène-8-ol	1183	2,1	SM-IR
16	Myrtenol	1190	1	SM-IR
17	Verbeneone	1202	0,45	SM-IR
18	Fenchyl acétate	1208	1,1	SM-IR
19	Carvone	1210	0,3	SM-IR
20	Bornyl acetate	1278	6,3	SM-IR
21	Sabinyl acetate	1295	6,2	SM-IR
22	α - Ylangene	1350	0,65	SM-IR
23	α - Copaene	1353	1,25	SM-IR

24	Geranyl acetate	1365	0,55	SM-IR
25	Sativene	1396	0,25	SM-IR
26	β - Caryophyllene	1438	0,4	SM-IR
27	α -Humulène	1472	0,6	SM-IR
28	δ -Cadinène	1531	2,7	SM-IR
29	Spathuléol	1602	0,3	SM-IR
30	(E) –Nerolidol	1609	2	SM-IR
31	Octadecane 1-Chloro	1819	0,2	SM-IR
Composés identifiés (%)		63,70		
Monoterpènes		10,65		
Monoterpènes oxygénés		43,05		
Sesquiterpènes		5,85		
Sesquiterpènes oxygénés		2,85		
Autres		1,3		

^[1]: Composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne OV-1 ; ^[2]: indice de rétention relatif aux n-alcanes C₉-C₂₃ ; ^[3]: 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.

L'analyse par CPG et CPG/SM de l'huile essentielle de *L. stoechas* a révélé la présence de 31 composés représentant 63,70% de la totalité des pics (Figures 57, 58 et 59). 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 60). 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%), camphor (6,85%), bornyl acétate (6,3%), sabinyl acétate (6,2%) et le 1,8-cineol (4,9%) (Figure 61). 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/camphor; 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 camphor (**Ristorcelli et al., 1998**).

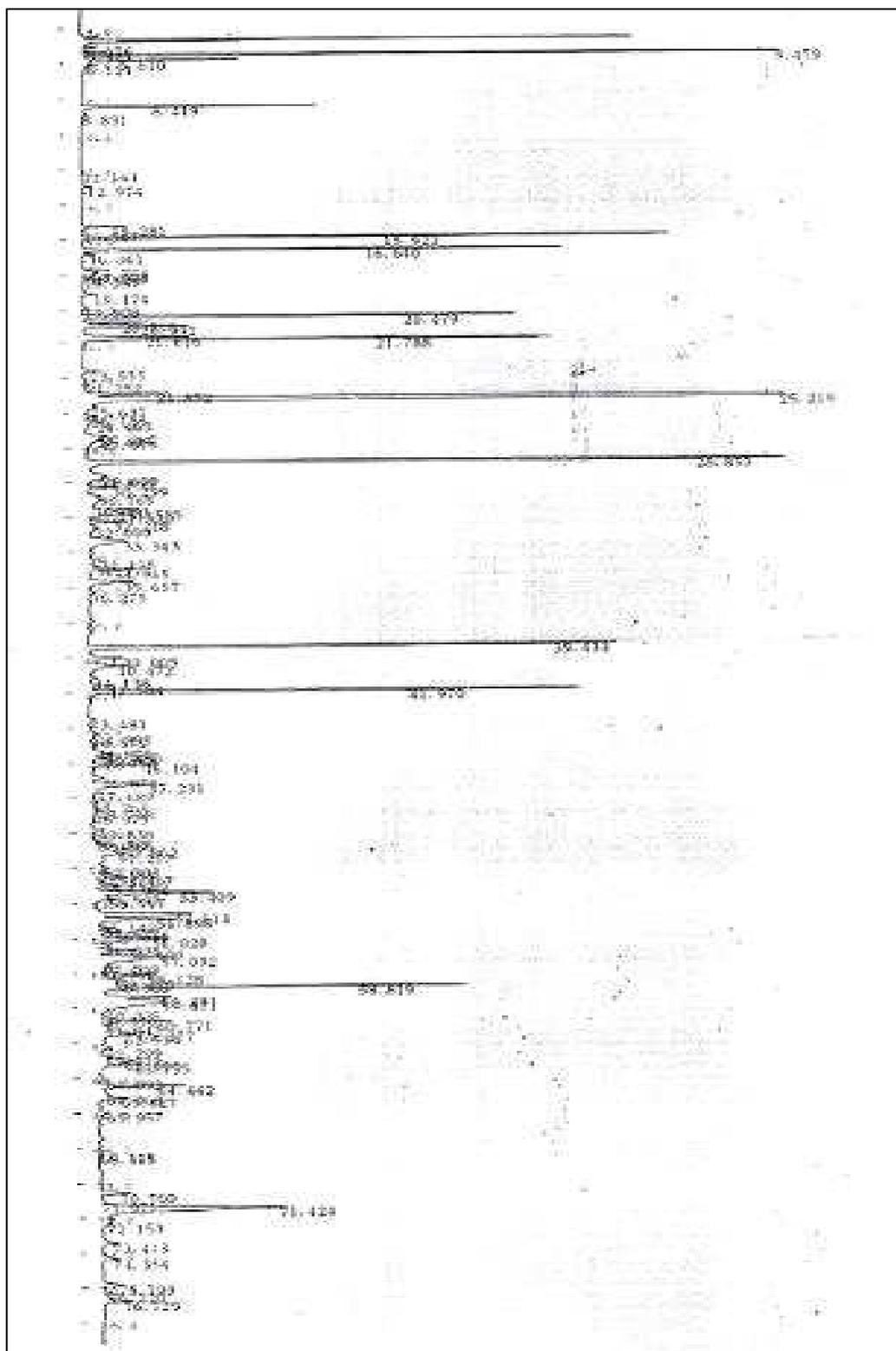
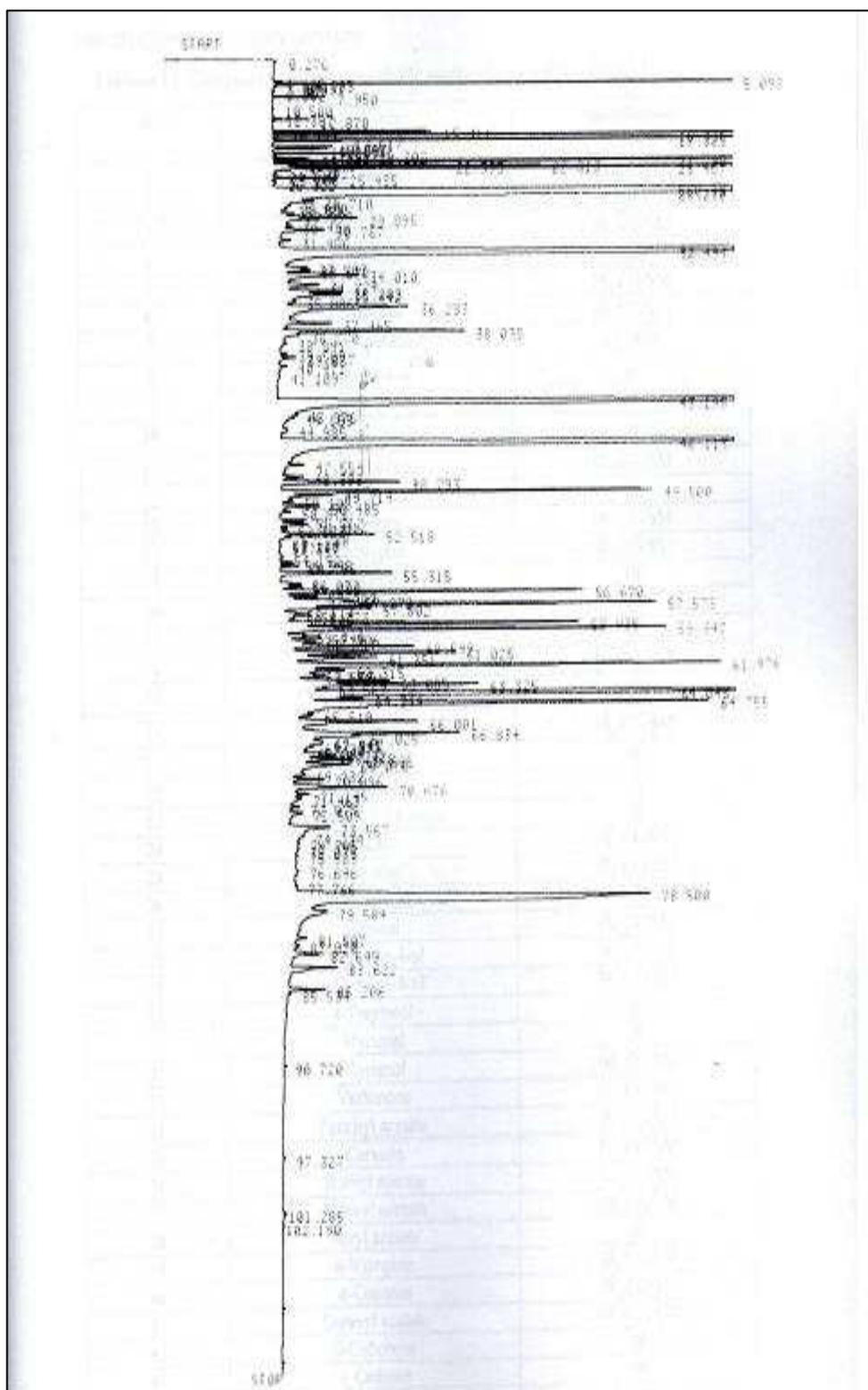


Figure 57: Chromatogramme CPG de l'huile essentielle de *L. stoechas* sur colonne DB-5



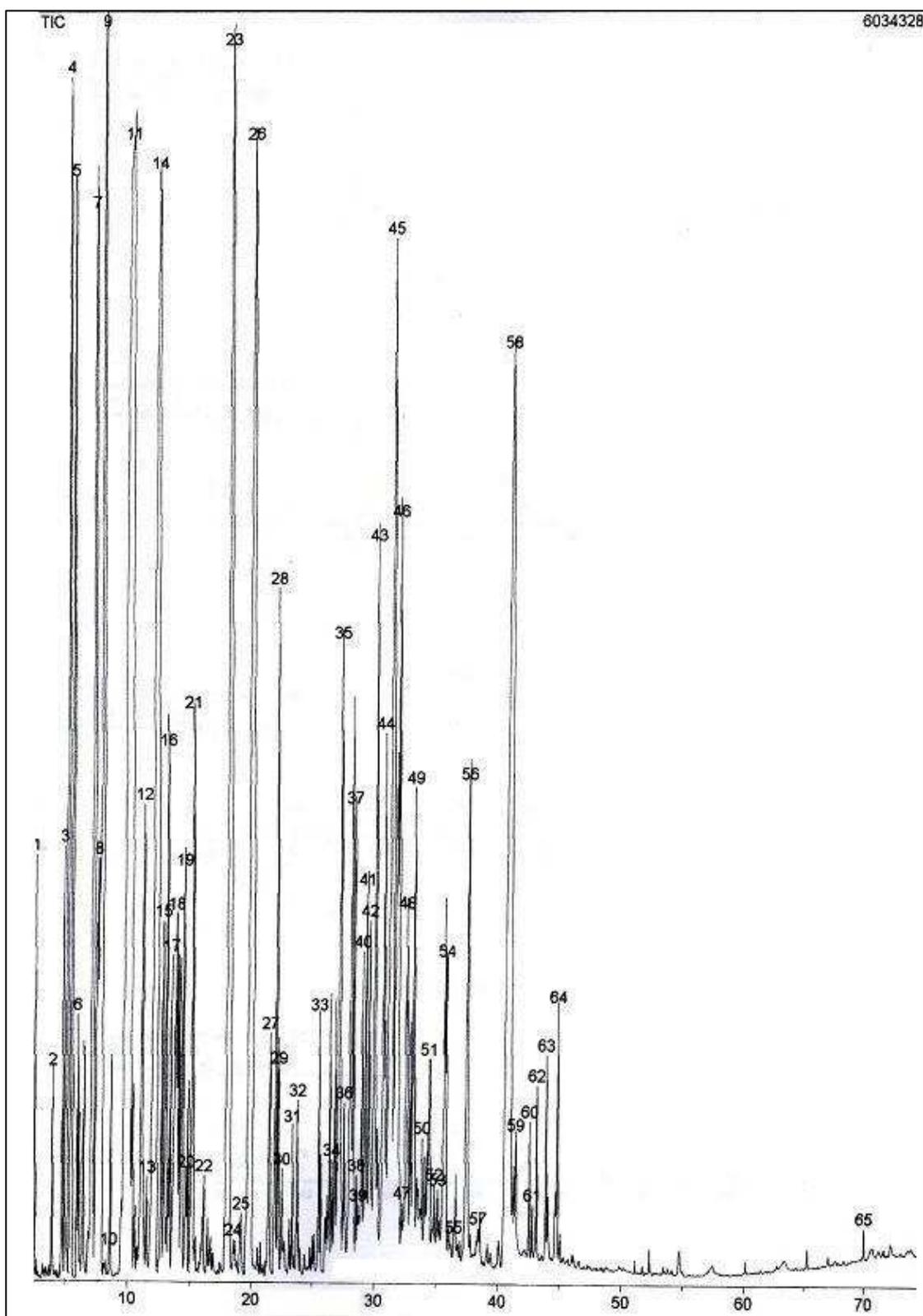


Figure 59: Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle de *L. stoechas* sur colonne OV-1

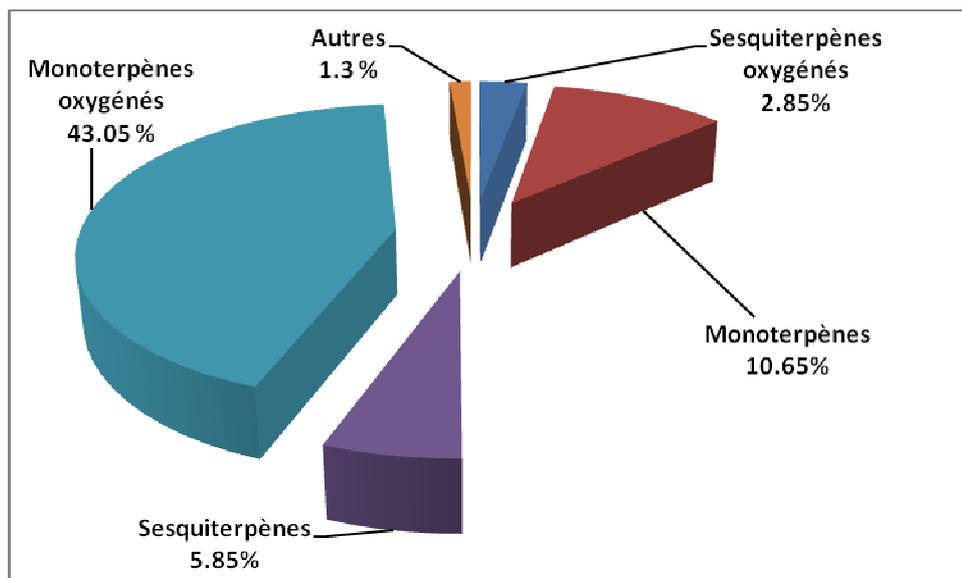


Figure 60: Familles chimiques de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas*

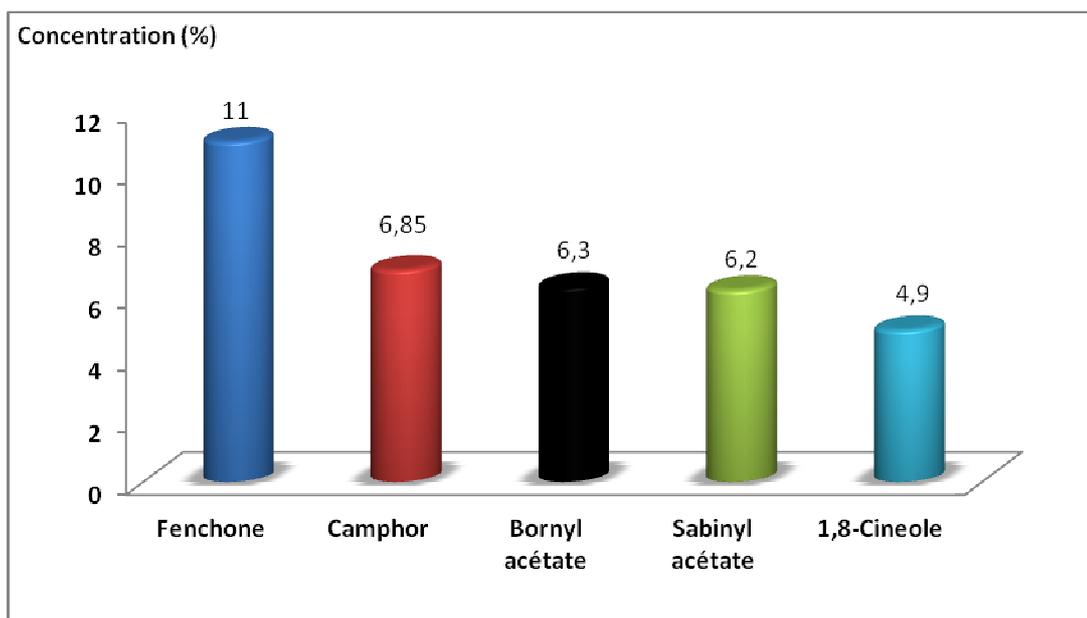


Figure 61: Principaux composés majoritaires de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas*

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 32: les mêmes composés majoritaires pour tous les échantillons. Cependant, les teneurs en fenchone, camphor 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.

Tableau 32: Teneurs en composés majoritaires de quelques échantillons de *L. stoechas*

Echantillon	Origine de <i>Lavandula stoechas</i>			
	Algérie ⁽¹⁾	Algérie ⁽²⁾	Turquie ⁽³⁾	Grèce ⁽⁴⁾
Fenchone (%)	11	27,6	32,03	45,19
Camphor (%)	6,85	18,1	14,71	9,90
Bornyl acétate (%)	6,3	3,2	1,68	-
Sabinyl acétate (%)	6,2	-	-	-
1,8-Cineole (%)	4,9	18,9	7,67	16,30

(1) : Echantillon étudié ; (2) : (Mohammedi, 2006); (3) : (Giray et al., 2008); (4) : (Hassiotis, 2010).

3.2.3. Composition chimique de l'huile essentielle d'Aneth :

L'analyse par CPG seule et CG/SM de l'HE de l'Aneth provenant de la région de Bir-Khadem (Alger) nous a permis d'obtenir les résultats de l'identification des constituants de cette dernière qui sont regroupés dans le tableau 33 et les figures 62 et 63.

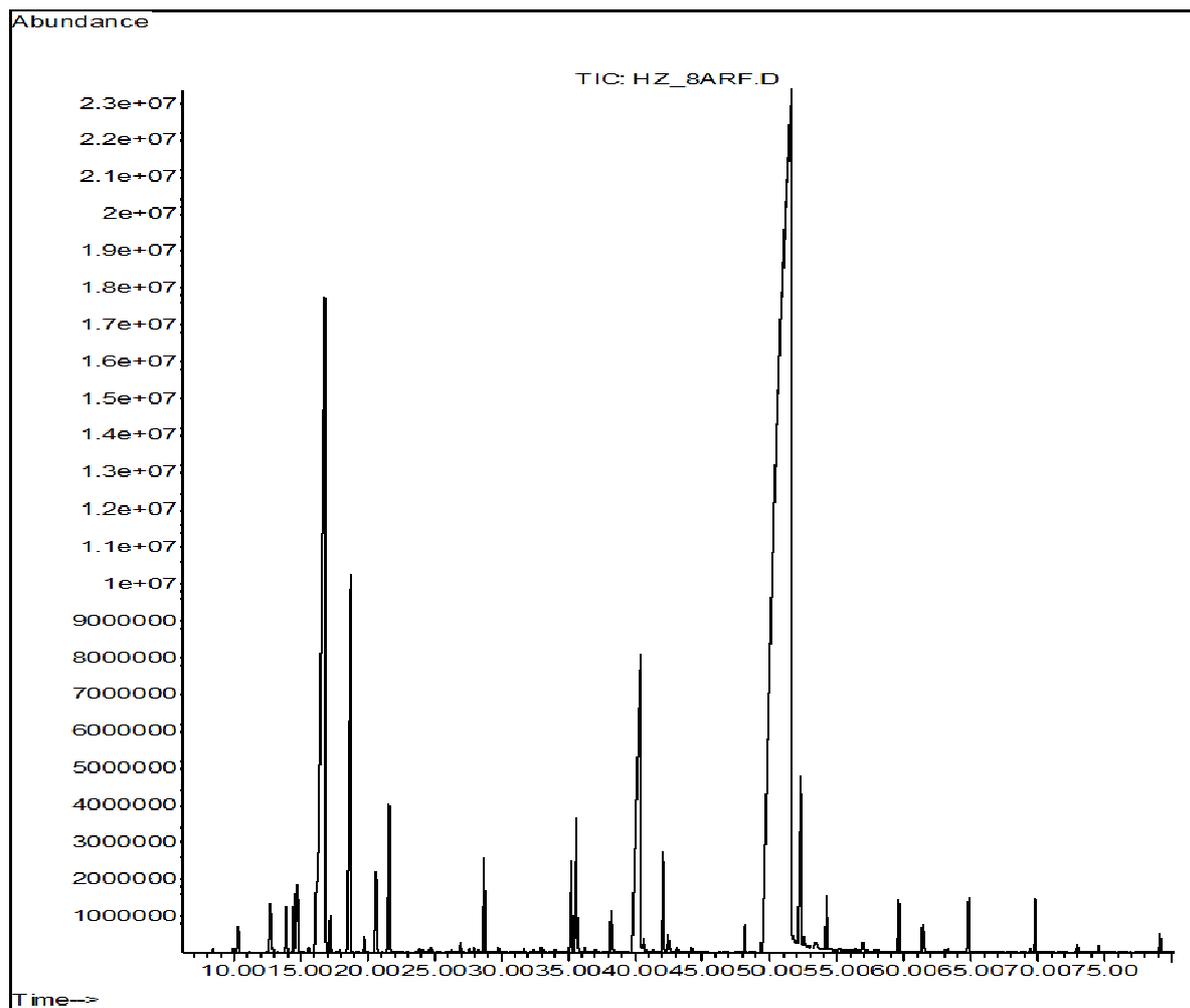


Figure 62: Chromatogramme de l'HE extraite à partir des fruits d'*Anethum graveolens*.

Tableau 33: Composition chimique de l'HE extraite par hydrodistillation à partir du fruit d'*Anethum graveolens*.

N ^o	Composés	KI	%	** Identification
1	α -Thujene	925	0,2	RI-MS
2	α -Pinene	935	2,1	RI-MS-E
3	Sabinene	972	1,4	RI-MS-E
4	β -Pinene	976	0,5	RI-MS-E
5	β -Myrcene	992	0,3	RI-MS-E
6	α-Phellandrene	1005	15,7	RI-MS-E
7	Limonene	1029	14,6	RI-MS-E
8	cis- β -Ocimene	1047	0,5	RI-MS

9	trans- β -Ocimene	1052	0,1	RI-MS
10	γ-Terpinene	1060	8,6	RI-MS-E
11	Fenchone	1094	7,2	RI-MS
12	Linalool	1104	0,6	RI-MS-E
13	Fenchol	1106	0,1	RI-MS
14	Chrysanthenone	1110	t	RI-MS
15	Terpinen-1-ol	1132	t	RI-MS
16	Camphor	1144	0,4	RI-MS-E
17	Terpinen-4-ol	1177	0,2	RI-MS-E
18	α -Terpineol	1190	0,3	RI-MS-E
19	Estragol	1195	0,6	RI-MS
20	Fenchyl acétate	1227	0,1	RI-MS
21	Pulegone	1245	0,1	RI-MS
22	Piperitone	1251	t	RI-MS
23	Bornyl acétate	1285	t	RI-MS-E
24	Thymol	1297	0,5	RI-MS-E
25	Carvacrol	1317	0,7	RI-MS-E
26	Piperitenone	1351	0,2	RI-MS
27	α -Copaene	1372	0,1	RI-MS
28	Piperitenone oxide	1370	1,7	RI-MS
29	Methyleugenol	1409	0,1	RI-MS
30	β -Caryophyllène	1417	t	RI-MS-E
31	Germacrene D	1480	0,4	RI-MS
32	Bicyclogermacrene	1495	t	RI-MS
33	β -Bisabolene	1506	0,1	RI-MS
34	δ -Cadinene	1519	t	RI-MS
35	Myristicine	1530	39,2	RI-MS
36	Elemicine	1552	1,5	RI-MS
	Composés identifiés (%)		98,1	
	Monoterpènes		27,77	
	Monoterpènes oxygénés		48,33	
	Sesquiterpènes		22,00	

*KI : indices de rétention sur colonne HP5MS par rapport à la série d'alcane normaux C8-C21 ; **Identification : SM : par comparaison des spectres de masse à ceux de la littérature et à ceux de la banque de spectres de masse (NIST 2005); Sd : par comparaison à des standards analysés dans les mêmes conditions que les huiles essentielles. t= trace (concentration < 0.05).

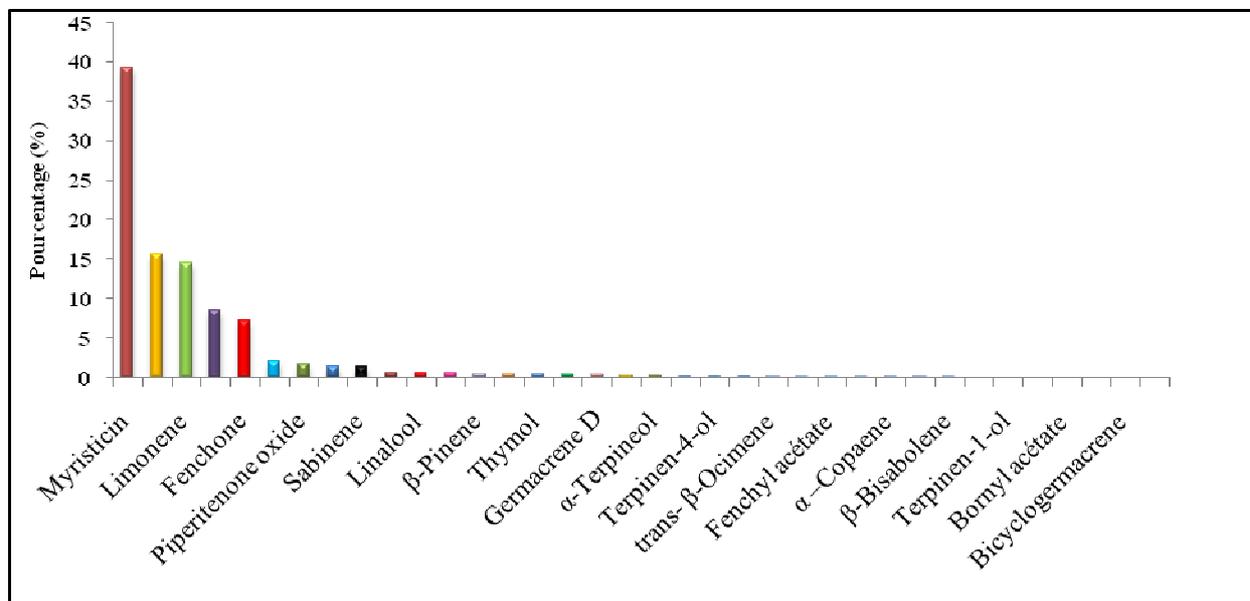


Figure 63: Histogramme des différents constituants d'*Anethum graveolens*

La figure 64 représente les différentes classes chimiques composant l'HE de l'Aneth.

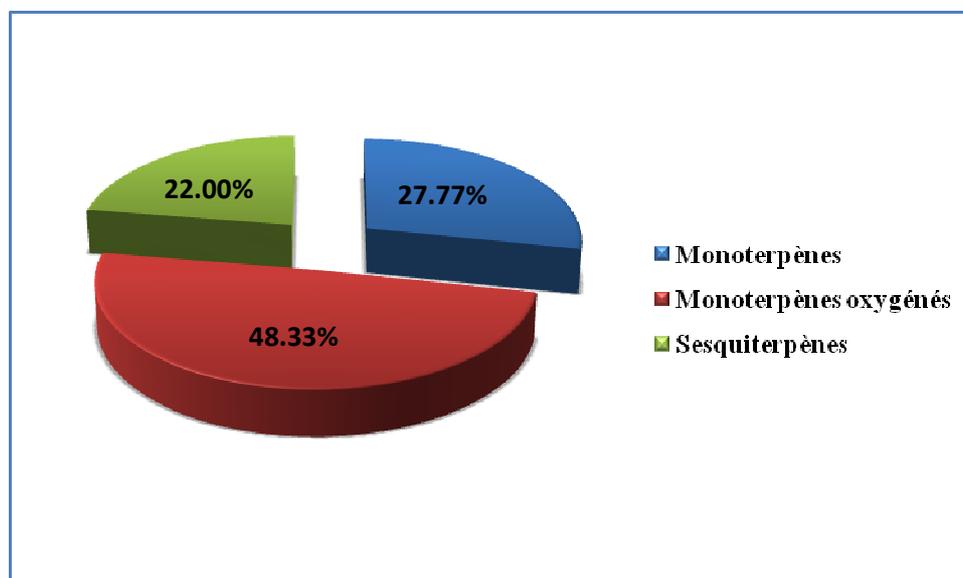


Figure 64: Les différentes classes chimiques composant l'HE de l'aneth.

La figure 65 représente les constituants majoritaires de l'HE de l'Aneth.

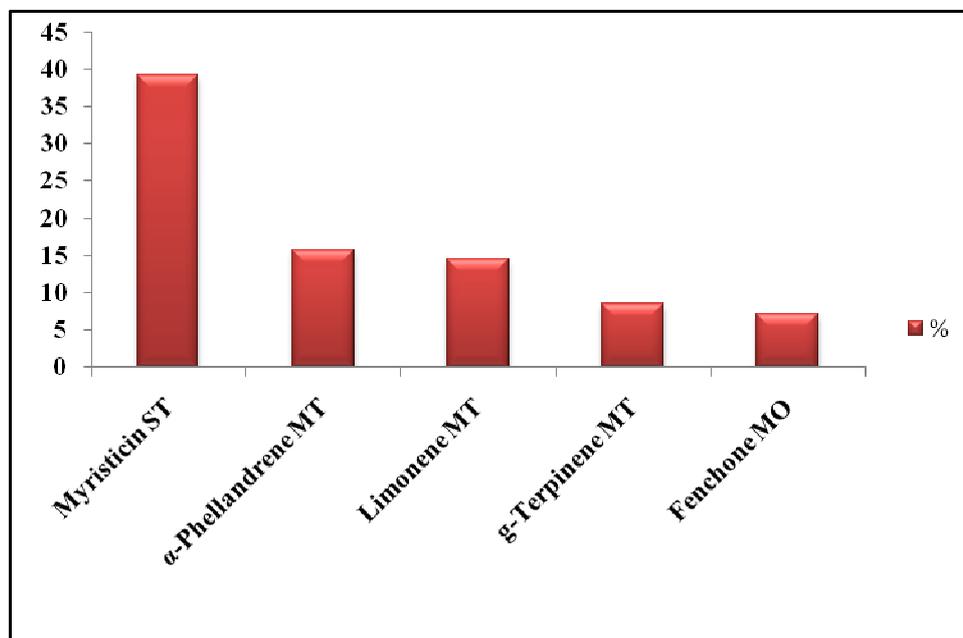


Figure 65: Histogramme des constituants majoritaires d'*Anethum graveolens*

Les **36** composés identifiés correspondent à une teneur de **98,1%** de l'ensemble de l'HE injectée. Nous remarquons une dominance des composés Monoterpéniques oxygénés avec un taux de **48.33%**. Le principal composé est le **myristicin** avec une teneur de (**39.1%**) suivi l' **α -phallendrene** (**15.7%**), le **limonène** (**14.6%**), **γ -terpinene** (**8.6%**) et le **fenchone** (**7.2%**).

Le tableau 34 regroupe les résultats comparatifs entre les teneurs de quelques constituants majoritaires de l'HE d'*Anethum graveolens* cités dans la littérature. Le tableau 37 montre une variation dans la composition chimique des HE citées dans la littérature, cette différence est d'ordre qualitative est quantitative dans tous les cas mentionnés ci-dessus. La divergence notée dans le profil chimique des HE dépend d'un grand nombre de paramètres, à savoir :

- Les conditions climatiques, géographiques et saisonnières (la teneur en composés majoritaires de l'HE d'aneth extraite à partir des feuilles est plus élevée pendant la saison estivale par rapport à la période hivernale selon (Vokk et al., 2011).
- La période de récolte
- Les techniques d'extraction.

Selon l'étude menée par **Radulescu et al., 2010** en Roumanie, la composition chimique de l'HE d'*Anethum graveolens* est étroitement liée aux parties (organes) de la plante utilisées pour l'extraction de l'huile.

Tableau 34: Comparaison des teneurs de quelques composés des HE de l'espèce *Anethum graveolens*.

Composé	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅
Myristicin	39,2	25,15	1,67	0,86	-	-
α -Phallandrene	15,7	47,74	62,49	-	-	-
Limonene	14,6	3,7	3,8	15,94	33	19,89
γ -Terpinene	8,6	1,75	0,05	0,19	-	0,34
Fenchone	7,2	-	-	-	-	-
β -phallandrene	6,2	7,40	7,48	-	20,61	0,75
Carvone	3,5	2,62	-	38,9	30 à 60	36,09
D carvacrol	0,7	-	-	-	-	0,21
Dill Apiole	-	0,62	0,05	30,81	-	16,83
E dihydrocarvacrone	-	0,06	0,08	10,99	-	6,59

A₀: *Anethum graveolens* d'Algérie- Birkhadem (Alger) (Notre échantillon).

A₁: *Anethum graveolens* d'Estonie récoltée en hiver (Vokk et al., 2011)

A₂: *Anethum graveolens* d'Estonie récoltée en été (Vokk et al., 2011)

A₃: *Anethum graveolens* du Pakistan (Babri et al., 2012)

A₄: *Anethum graveolens* de Roumanie (Isopencu et Ferdes., 2012)

A₅: *Anethum graveolens* d'Iran (Mahmoodi et al., 2012)

Tableau 35: Comparaison de la composition chimique en constituants majoritaires de l'HE d'*Anethum graveolens* extraite à partir des feuilles, fleurs et du fruit (**Radulescu et al., 2010**) avec nos résultats :

Composés	Feuilles ^a	Fleurs ^a	Fruits ^a	Fruits ^b
α -phellandrene	62,71	30,26	0,12	15,7
Limonene	13,28	33,22	21,56	14,6
Carvone	-	10,29	75,21	3,5

^a: *Anethum graveolens* (Feuilles, Fleurs et Fruits) de Roumanie (**Radulescu et al., 2010**).

^b: *Anethum graveolens* (Fruits) d'Algérie (**Notre échantillon**).

3.2.4. Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de l'érigéron (*Conyza canadensis*) :

La composition de l'huile essentielle de l'érigéron a été analysée par la CPG et CPG/SM, donnant des chromatogrammes représentés par la figure 66. Les résultats sont consignés dans le tableau 36 et illustrés par la figure 67. Au total, 44 composés ont été identifiés, ce qui correspond à un pourcentage de 90.2% par rapport à l'ensemble des constituants. L'huile essentielle est composée principalement d'hydrocarbures terpéniques dont 38.63% sont des sesquiterpènes, 20.45% sont des monoterpènes, 13.63% sont des sesquiterpènes oxygénés et enfin les monoterpènes oxygénés qui représentent 11.36%.

Tableau 36 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de l'érigéron (*Conyza canadensis*)

N°	IK	Composé	%	Identification
1	704	Furan, 2-ethyl	t	RI-MS
2	791	2-Hexanone	0.1	RI-MS
3	850	2-Hexenal	0.1	RI-MS
4	925	α -Thujene	t	RI-MS
5	935	α -Pinene	0.2	RI-MS-E
6	948	Camphene	t	RI-MS-E
7	965	Ethyltoluene	t	RI-MS
8	976	β -Pinene	1.6	RI-MS-E
9	992	β -Myrcene	0.5	RI-MS-E
10	1105	α -Phellandrene	t	RI-MS-E
11	1029	Limonene	4.3	RI-MS-E
12	1039	cis- β -Ocimene	0.3	RI-MS
13	1042	trans- β -Ocimene	6.1	RI-MS
14	1100	Rosefuran	t	RI-MS
15	1125	Benzene, 1-ethyl-2,3-dimethyl	t	RI-MS
16	1132	Durene (Benzene, 1,2,4,5-	0.1	RI-MS

		tetramethyl ou Durol)		
17	1144	Camphor	0.1	RI-MS-E
18	1150	Menthone	0.1	RI-MS
19	1155	Menthol	0.2	RI-MS
20	1190	α -Terpineol	t	RI-MS-E
21	1245	Pulegone	0.3	RI-MS
22	1336	Bicycloelemene	0.2	RI-MS
23	1366	α -Cubebene	t	RI-MS
24	1370	α -Copaene	0.1	RI-MS
25	1394	β -Elemene	1.7	RI-MS
26	1415	β -Caryophyllene	8.2	RI-MS-E
27	1428	γ -Elemene	0.3	RI-MS
28	1435	α -Bergamotene	0.7	RI-MS
29	1450	α -Humulene	0.9	RI-MS
30	1451	E- β -Farnesene	8.0	RI-MS
31	1477	Germacrene D	6.3	RI-MS-E
32	1492	Bicyclogermacrene	2.8	RI-MS
33	1495	Zingiberene	0.6	RI-MS
34	1506	β -Bisabolene	0.6	RI-MS
35	1511	γ -Cadinene	0.2	RI-MS
36	1515	E-E- α -Farnesene	0.4	RI-MS
37	1518	δ -Cadinene	0.4	RI-MS
38	1525	β -sesquiphellandrene	1.0	RI-MS

39	1527	(Z,E)-Matricaria ester	42.4	RI-MS
40	1533	t-Cadinol	0.2	RI-MS
41	1636	t-Muurolol	1.4	RI-MS
42	1650	α -Cadinol	0.7	RI-MS
43	1652	α -Eudesmol	0.3	RI-MS
44	2121	Phytol	1.1	RI-MS
		Total	90.2%	

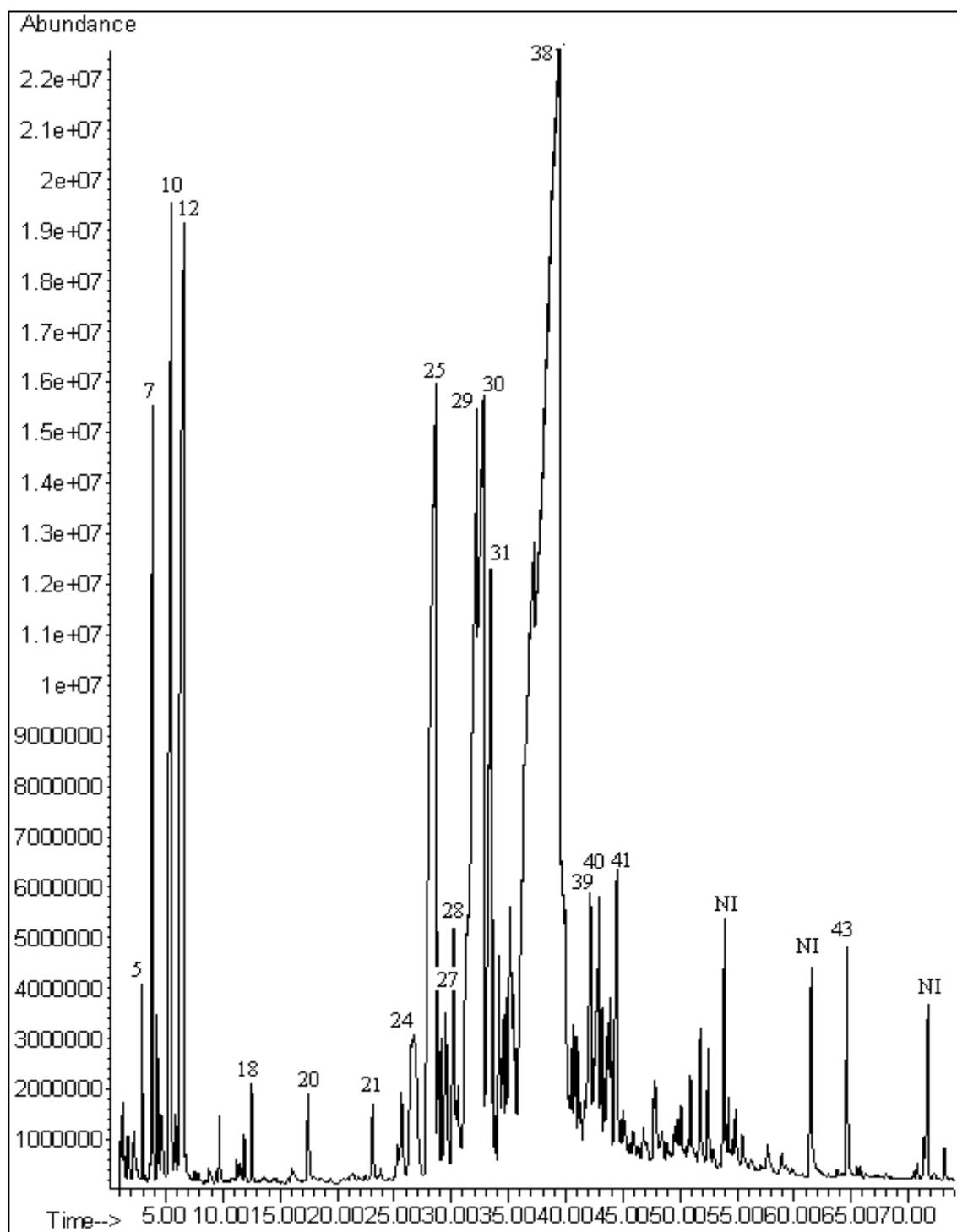


Figure 66: Chromatogramme en GC-MS de l'huile essentielle de *Conyza canadensis* (les numéros sur les pics correspondent aux numéros d'ordre du tableau de la composition chimique ; NI : non identifié)

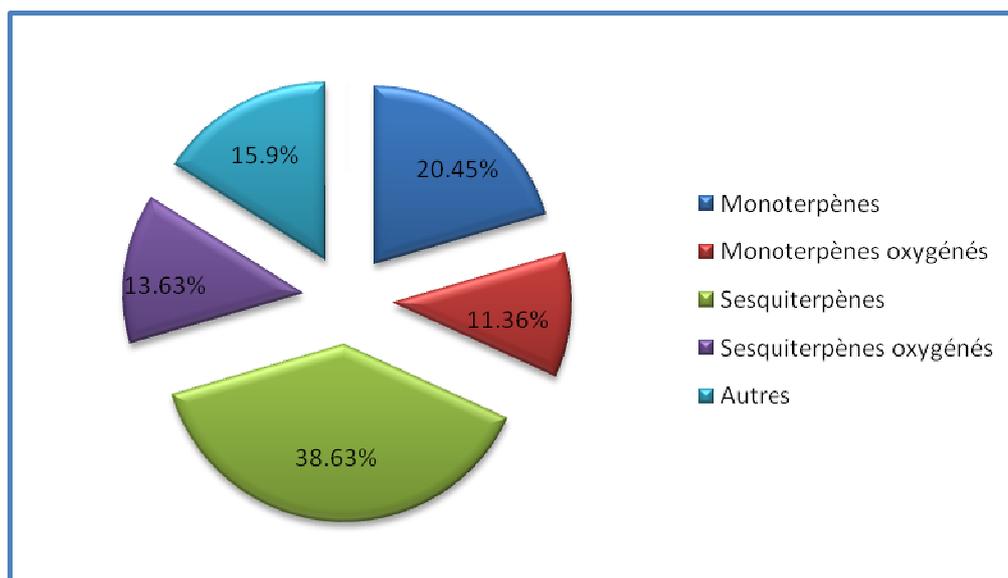


Figure 67: Les pourcentages des familles des composés chimiques déterminés dans l'HE de l'érigéron.

L'huile essentielle de l'érigéron comprend comme composés majoritaires le **(Z,E)-Matricaria ester** qui représente à lui seul **42.4%** des composés identifiés suivi par le **β -Caryophyllène (8.2%)**, **E- β -Farnesène (8.0%)**, **Germacrene D (6.3%)**, **trans- β -Ocimène (6.1%)** et le **Limonène (4.3%)**.

Cette huile est caractérisée par un taux élevé d'un sesquiterpène oxygéné (Z,E)-Matricaria ester à 42.4% et dont la structure chimique est représentée par la figure 68.

L'étude de la composition chimique de l'huile de cette même plante issue d'autres provenances, a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche. Les résultats obtenus par différents chercheurs ont révélé l'existence d'une différence de point de vue nature et proportions de ses composés identifiés.

Le (Z,E)-Matricaria ester qui représente le principal composé de notre échantillon est rarement rencontré dans la composition chimique des huiles essentielles de la même plante provenant d'autres régions, en plus sa concentration reste relativement faible. Une exception a été enregistrée pour l'HE de l'érigéron originaire d'Amérique qui renferme le **(Z,E)-Matricaria ester** comme l'un des composés majoritaires avec un taux de 9.2%. (**Rustaiyan et al., 2004 ; Lis et al., 2000**).

Le limonène est le constituant le plus fréquemment identifié comme l'un des composés majoritaires. Les études réalisées ont révélé qu'il prédomine la composition chimique de l'HE de *Conyza canadensis* avec une concentration dépassant le plus souvent 60%. L'huile

essentielle de la vergerette de Canada provenant de la Bulgarie renferme 87.9 % de limonène (Stoyanova et al., 2003) celle de la France 79.03 % (Curini et al., 2003) et celle de Pologne 70% (Rustaiyan et al., 2004), ce qui est largement supérieur à la concentration obtenue pour notre huile essentielle (4.3%).

Les analyses effectuées sur L'HE de l'érigéron de plusieurs pays ont montré une diversité des composés majoritaires qui caractérisent la composition chimique de ces huiles (Tableau et figures). Cette différence sur le plan qualitatif et quantitatif peut être attribuée à plusieurs facteurs. Les paramètres pédologiques et climatiques influencent directement le métabolisme secondaire de la plante ainsi que la récolte la météorologie au moment de la récolte et la période de végétation.

Les études qui ont traité la composition chimique des différentes espèces su genre *Conyza* ont révélé une grande variabilité chimique. 60 composés représentant 96.2% de l'HE de *Conyza acris* ont été identifiés, en plus cette huile est caractérisée par le limonène (38.8%), le β -pinène+sabinène (15.6%) et le β -ocimène (13.5%) comme composés majoritaires (Nazaruk et al., 2006).

L'HE de *Conyza albida* renferme 55 composés dont le **cis-lachnophyllum ester (29.98%)** comme constituant principal accompagné de Germacrène-D (12.89%), E-(β) farnesène (12.45%) et le limonène (11.19%) (Tzakou et al., 2004). Tandis que (Z,E)-**Matricaria ester** n'est présent que sous forme de traces dans l'HE de *Conyza albida*.

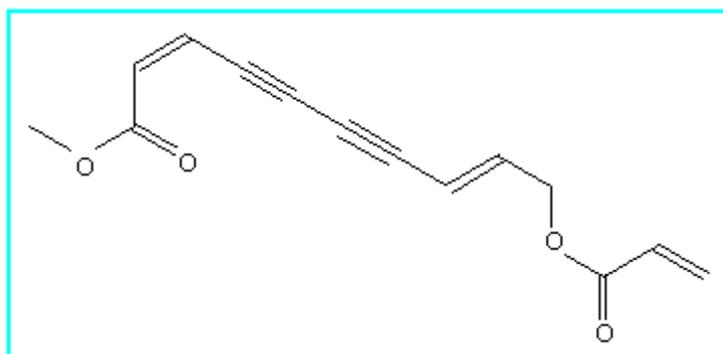


Figure 68: Structure chimique du (Z,E)-Matricaria ester

4. Activité biologiques des extraits volatils et non-volatils étudiés :

I. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'aneth :

Etude qualitative de l'HE testée :

L'évaluation de l'activité inhibitrice a été effectuée par la méthode des disques (Aromatogramme). Les mesures des diamètres des zones d'inhibition ont pour but de mettre en évidence l'action des HE sur les souches microbiennes testées. A cet effet, une échelle de mesure de l'activité antimicrobienne émise par **Ela et al., (1996)**, **Meena et Sethi (1994)**, répartissant les diamètres des zones d'inhibition en 4 classes:

- ✓ Fortement inhibitrice: lorsque le diamètre de zone d'inhibition est > 28 mm ;
- ✓ Modérément inhibitrice: le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 16 mm et 28 mm ;
- ✓ Légèrement inhibitrice: le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 10 mm et 16 mm ;
- ✓ Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est < 10 mm.

Ainsi, l'interprétation de nos résultats se fait par la comparaison entre les résultats des tests effectués avec ceux donnés par l'échelle ci-dessus considérée comme témoin comparatif. Les résultats obtenus relatifs aux diamètres des zones d'inhibition par les HE en utilisant le test de l'aromatogramme sont regroupés dans le tableau 37.

Tableau 37: Sensibilité des souches étudiées aux HE de l'aneth (Diffusion en mm par disque \pm Standard déviation).

Souche	Diffusion en mm par disque
<i>Bacillus subtilis</i>	19,00 \pm 0,00
<i>Escherichia coli</i>	14,00 \pm 0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,00 \pm 1,41
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,50 \pm 0,71
<i>Candida albicans</i>	19,50 \pm 0,71

On constate pour l'HE de l'aneth, une activité inhibitrice modérée vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Alors qu'un léger pouvoir inhibiteur est enregistré contre *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

L'HE de l'Aneth présente des propriétés antimicrobiennes nettement plus élevées au cours de la saison estivale (Vokk et al., 2011). Les constituants les plus actifs semblent être des composés phénoliques aromatiques avec un large éventail antimicrobien (Tajkarimi et al., 2010). Cependant, il est possible que l'activité antimicrobienne soit liée à la présence d'autres constituants mineurs (Hoet et al., 2006), Myristicine, α - thujene, α -pinène, sabinene et d'autres composés des huiles essentielles sont également signalés pour être responsables des activités antibactérienne et antifongique des épices et des herbes (Tajkarimi et al., 2010).

Selon Vokk et al., 2011, le test de sensibilité réalisé sur quatre souches microbiennes vis-à-vis de l'HE d'*Anethum graveolens* révèle des zones d'inhibition qui varie de 8 à 29.5 mm. Le tableau 38 récapitule les résultats obtenus.

Tableau 38: Sensibilité de quelques souches microbiennes vis-à-vis de l'HE d'aneth en fonction de la saison et de l'organe d'extraction (Vokk et al., 2011).

Micro-organismes testés	HE d'Aneth (saison hivernale)	HE d'Aneth (saison estivale)	HE d'Aneth (graine)
<i>Staphylococcus albus</i>	8.0	26.0	11.0
<i>Bacillus mesentericus</i>	-	25.0	15.0
<i>E.coli</i>	9.0	29.5	19.0
<i>Aspergillus flavus</i>	8.0	24.7	16.5

Dans le cas d'*E.coli* les résultats de cette étude sont en accord avec nos résultats (9mm <14 mm< 29.5mm). L'effet de l'HE d'*Anethum graveolens*, ainsi que la poudre de la plante d'aneth séchée sur la croissance d'*E. Coli* a été démontré (Isopencu et Ferdes, 2012).

Sur la base des résultats obtenus par Hong et al., 2011, on peut affirmer que l'huile essentielle extraite des graines d'*Anethum graveolens* possède une activité anti-*Candida in vitro* et *in vivo*.

Selon Valero et Salmeron (2003) et Pibiri (2006), il est très difficile de faire une comparaison entre les résultats trouvés et ceux rapportés par la littérature, ceci pourrait s'expliquer par:

- Nature du matériel végétal (l'espèce, l'HE, origine géographique, altitude, saison de cueillette) ;
- Procédé d'extraction ;
- Composition chimique des HE utilisées ;
- Niveau de pureté du produit final et sa conservation ;
- Nature des souches testées ;
- Méthodes utilisées pour estimer l'activité antimicrobienne ;
- Milieux de culture employés (milieu synthétique ou naturel) ;
- Qualité des souches testées.

Les zones d'inhibition des HE testées sur les différentes souches utilisées sont illustrées par les figures 69 au 73.

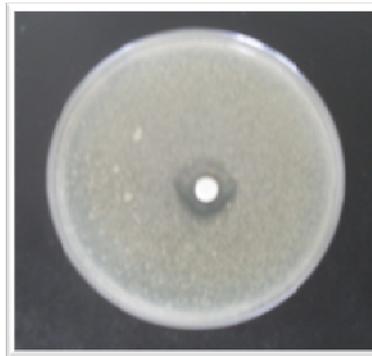


Figure 69: Zone d'inhibition de l'huile essentielle de l'aneth testée sur *Bacillus subtilis*

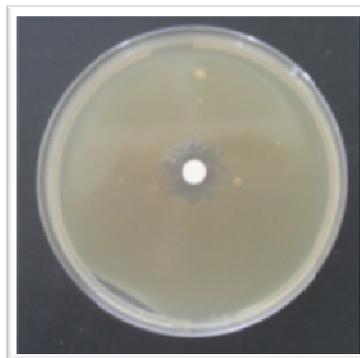


Figure 70: Zone d'inhibition de l'huile essentielle de l'aneth testée sur *Staphylococcus aureus*.

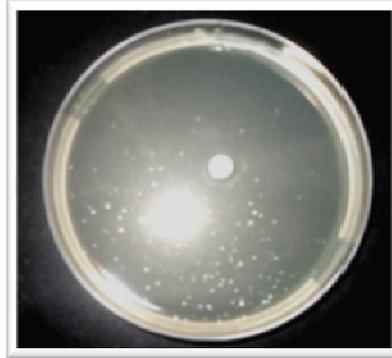


Figure 71: Zone d'inhibition de l'huile essentielle de l'aneth testée sur *Pseudomonas aeruginosa*.

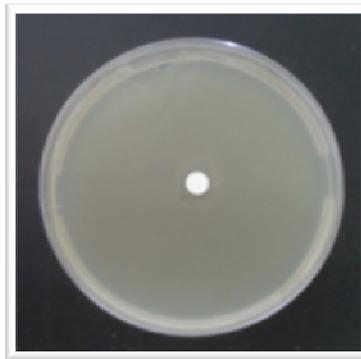


Figure 72: Zone d'inhibition de l'huile essentielle de l'aneth testée sur *Escherichia coli*



Figure 73: Zone d'inhibition de l'huile essentielle de l'aneth testée sur *Candida albicans*

1.1. Détermination de la CMI & de la CMB

Afin de confirmer les résultats trouvés précédemment dans l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne, nous avons procédé à la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des HE d'*Anethum graveolens* ainsi que la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB).

Les valeurs des CMI et des CMB des HE testées vis-à-vis des souches microbiennes sensibles sont représentées dans le tableau 39. Les résultats des CMI sont illustrés par les figures 74 et 75.

Tableau 39: Evaluation des CMI de l'huile essentielle d'aneth :

HE	Concentration	Micro-organismes testés				
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Huile essentielle d'Aneth	0.03%	+	+	+	+	+
	0.06%	+	+	+	+	+
	0.125%	+	+	+	+	+
	0.25%	-	+	+	+	+
	0.50%	-	+	+	+	+
	1%	-	-	+	+	-
	2%	-	-	+	-	-

+ : croissance microbienne, - : absence de croissance, - : CMI.

D'après les résultats obtenus, *Pseudomonas aeruginosa* est la souche la plus résistante vis-à-vis des HE étudiées, alors que *Bacillus subtilis* s'est avéré être la plus sensible (tableau 40).

Cette résistance de *Pseudomonas aeruginosa* est due à la capacité de celle-ci à former un biofilm. Ce dernier est une organisation complexe, composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se trouvent dans des états physiologiques spécifiques à leur situation. Ainsi, toute la population bactérienne n'est pas exposée simultanément et identiquement au produit (Pibiri, 2006).

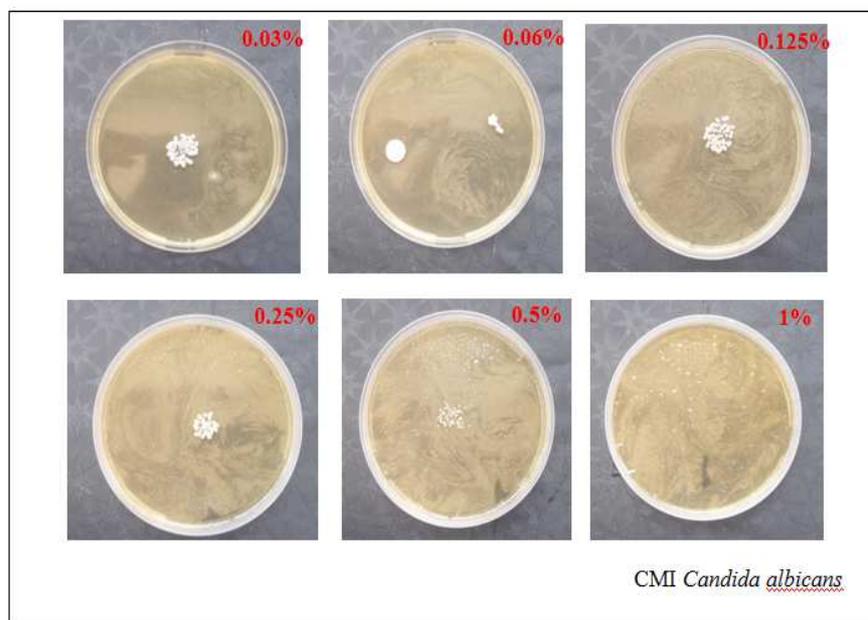
Les valeurs des CMI obtenues viennent affirmer les résultats de l'analyse qualitative (l'Aromatogramme).

Tableau 40: Concentration Minimales Inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d'Aneth

Souches	CMI (v/v)
<i>Bacillus subtilis</i>	0.25
<i>E.coli</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 2
<i>Candida albicans</i>	1

L'HE d'*Anethum graveolens* montre un pouvoir antimicrobien très moyen voir faible pour certaine souches, dans le cas de *Bacillus subtilis* on note une CMI de 0.25%, cette valeur est en accord avec les résultats de l'aromatogramme. Les valeurs de la CMI pour *E. coli* et *Candida albicans* sont de 1%, et pour *Staphylococcus aureus* on note une CMI de 2% ces résultats concordent avec les valeurs obtenues par le test de sensibilité.

Dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* la CMI n'a pas été déterminé (supérieure à 2%).

**Figure 74:** Illustration de la CMI de l'HE de l'aneth vis-à-vis de *Candida albicans*.

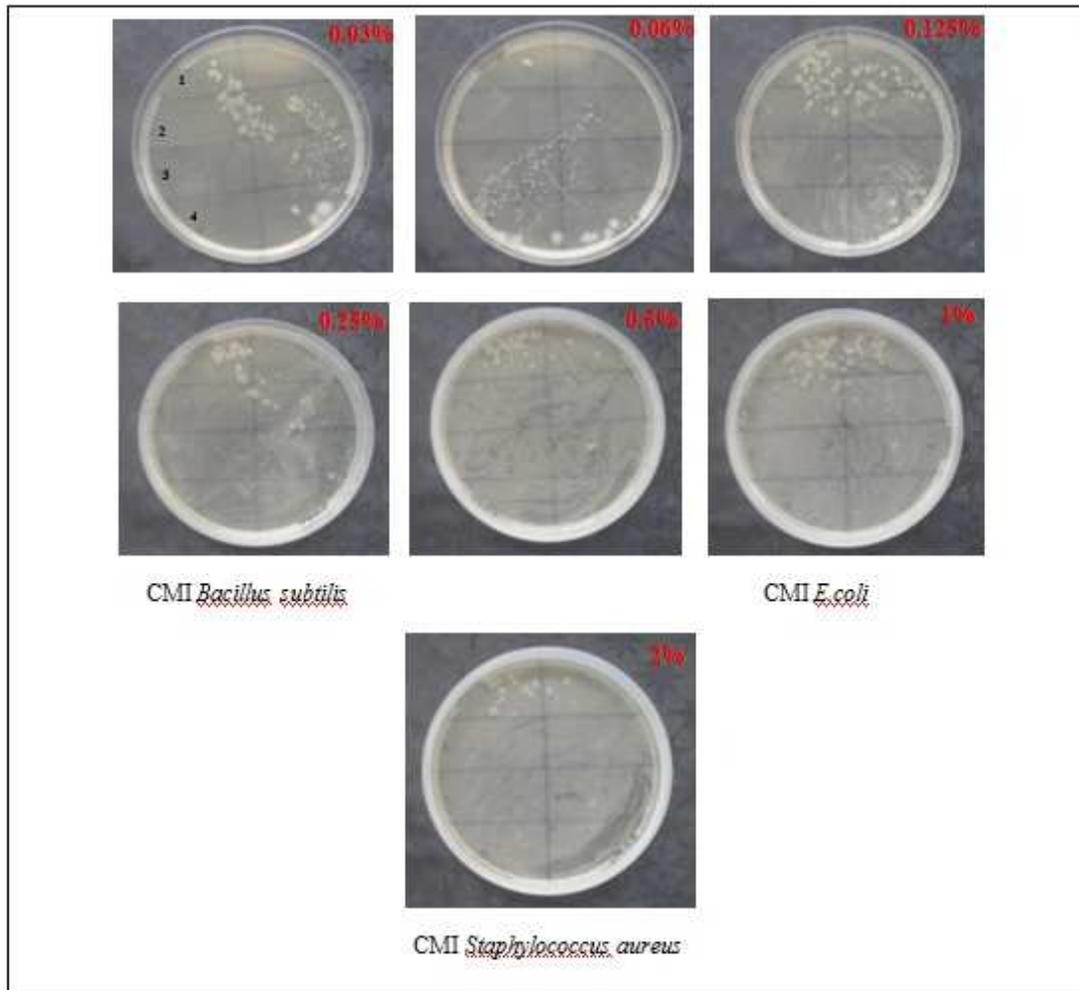


Figure 75: Illustration de la CMI de l'HE de l'aneth vis-à-vis des 4 souches bactériennes testées.

1 : *E. coli* / 2 : *Staphylococcus aureus* / 3 : *Pseudomonas aeruginosa* / 4 : *Bacillus subtilis*

II. Activité insecticide de l'huile essentielle de *L. stoechas* :

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.

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).

La figure 76 résume les mortalités corrigées des adultes de *C. maculatus* par inhalation de l'huile essentielle étudiée. Nous constatons que 'huile essentielle extraite à partir de la plante étudiée possèdent une activité biocide à l'égard des adultes de *C. maculatus*, l'effet de l'huile essentielle de lavande, est considérablement fort, au même temps l'évolution de la mortalité des insectes progressivement en fonction du temps est positive.

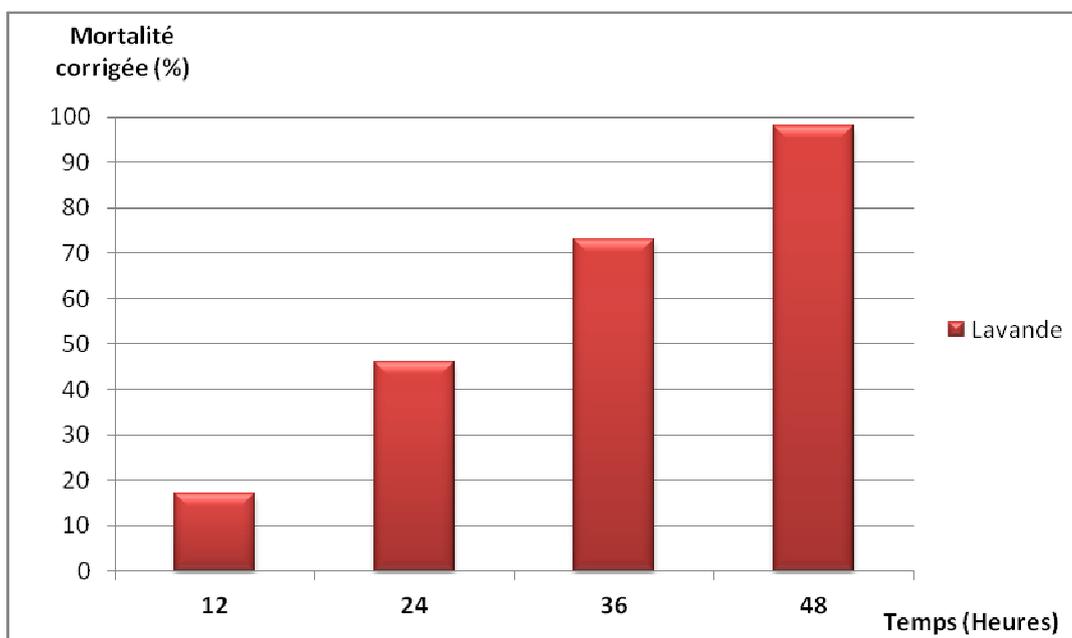


Figure 76: Mortalité corrigée des adultes de *C. maculatus* par inhalation de l'huile essentielle en fonction du temps.

Détermination des TL₅₀ et TL₉₀ de l'huile essentielle:

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% (Figure 77).

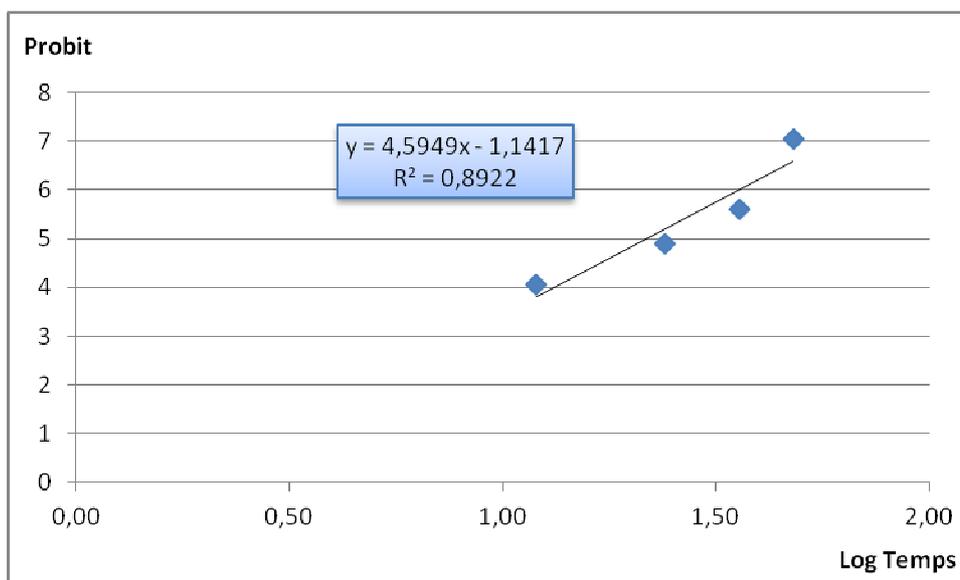


Figure 77: Détermination des TL₅₀ et TL₉₀ de l'huile essentielle de *L. stoechas* par effet inhalation vis-à-vis de *C. maculatus*.

Le tableau 41 rapporte les valeurs des temps létaux à 50% et à 90% des huiles essentielles étudiées :

Tableau 41: TL₅₀ et TL₉₀ de l'huile essentielle de lavande.

TL₅₀ (heures)	21,71
TL₉₀ (heures)	41,24

Le tableau 41 montre que l'huile essentielle de lavande est dotée d'une activité insecticide par effet inhalation. D'après ces résultats, nous constatons que l'huile essentielle de *L. stoechas* est très efficace sur les bruches de niébé avec des valeurs de TL₅₀ et TL₉₀ plus assez faibles ce qui permet d'atteindre la mortalité de 50% puis de 90% des adultes rapidement.

2. Toxicité par effet contact :

La mortalité des adultes de *C. maculatus* dans les bocaux contenant les graines de pois chiche traitées à l'huile essentielle étudiée 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 78 résume les résultats du test contact de la substance volatile.

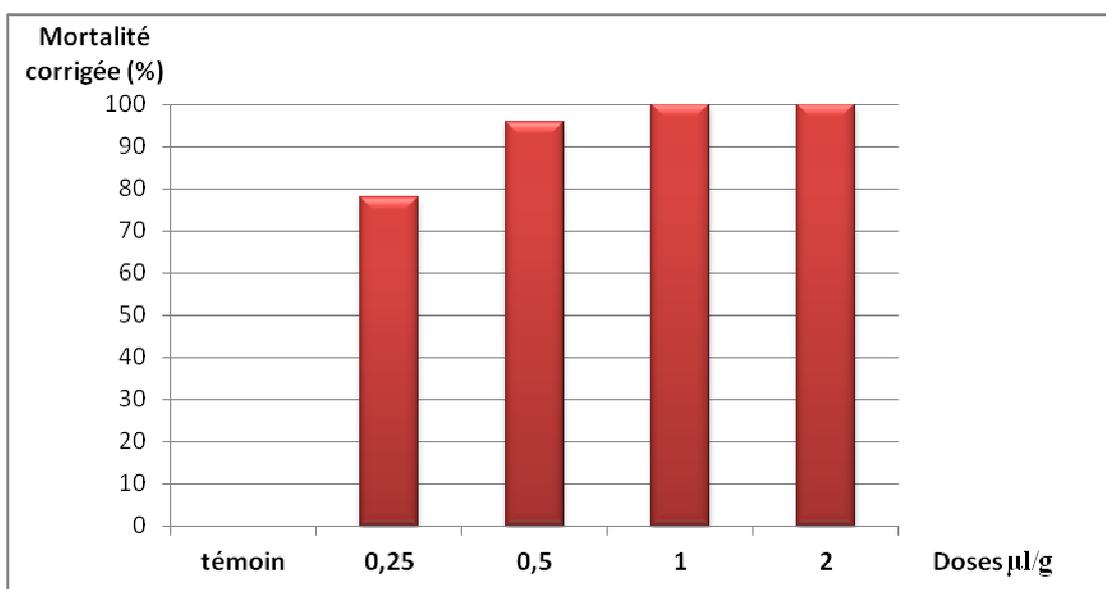


Figure 78: Mortalité corrigée des adultes de *C. maculatus* par effet contact en fonction des doses d'huile essentielle.

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 $\mu\text{l/g}$** . D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'huile essentielle extraite *L. stoechas* possède un effet toxique contre les adultes de *C. maculatus*; cet effet insecticide est proportionnel aux concentrations utilisées. En effet, une dose de **0,25 $\mu\text{l/g}$** 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**. Aux doses les plus faibles (**0,25 et 0,5 µl/g**), l'huile essentielle de lavande a manifesté un pouvoir insecticide élevé. **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*. **Iboudo 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 DL₅₀ et DL₉₀ 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 79).

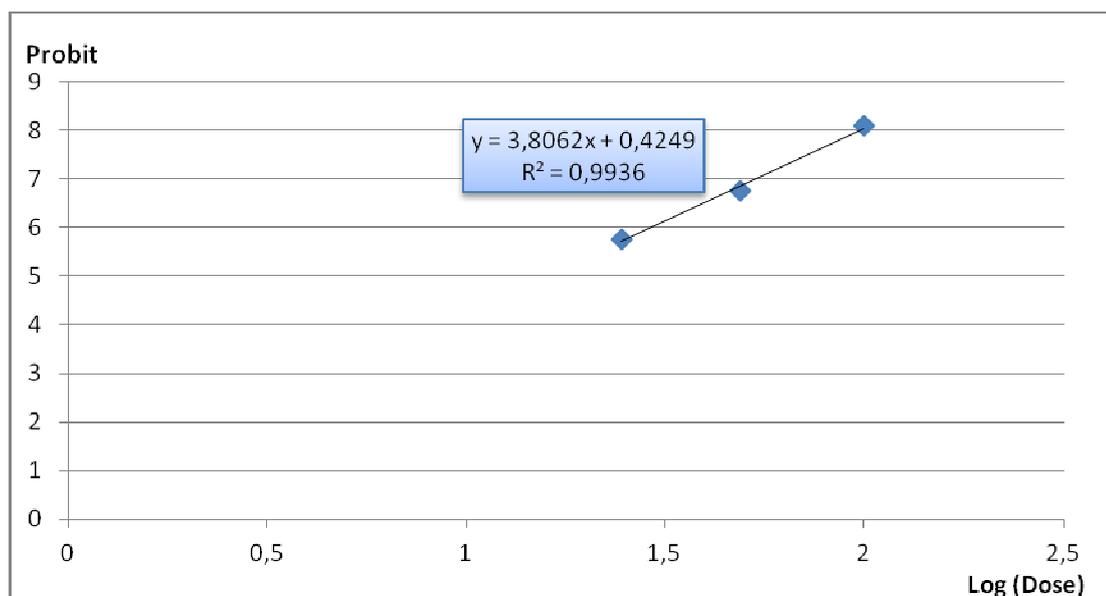


Figure 79: Détermination des DL₅₀ et DL₉₀ de l'huile essentielle de *L. stoechas* par contact.

Le tableau 42 rapporte les valeurs des doses létales à 50 et 90%.

Tableau 42: DL₅₀ et DL₉₀ de l'huile essentielle et de lavande.

DL ₅₀ µl/g	0,16
DL ₉₀ µl/g	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. Les résultats obtenus montrent que notre huile essentielle possède une forte activité insecticide vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus*, car elle agit à des concentrations faibles.

3. Evaluation de l'effet des huiles essentielles sur la fécondité:

La figure 80 rapporte le nombre d'œufs pondus par femelle de *C. maculatus* ayant subi le traitement avec l'huile essentielle de lavande.

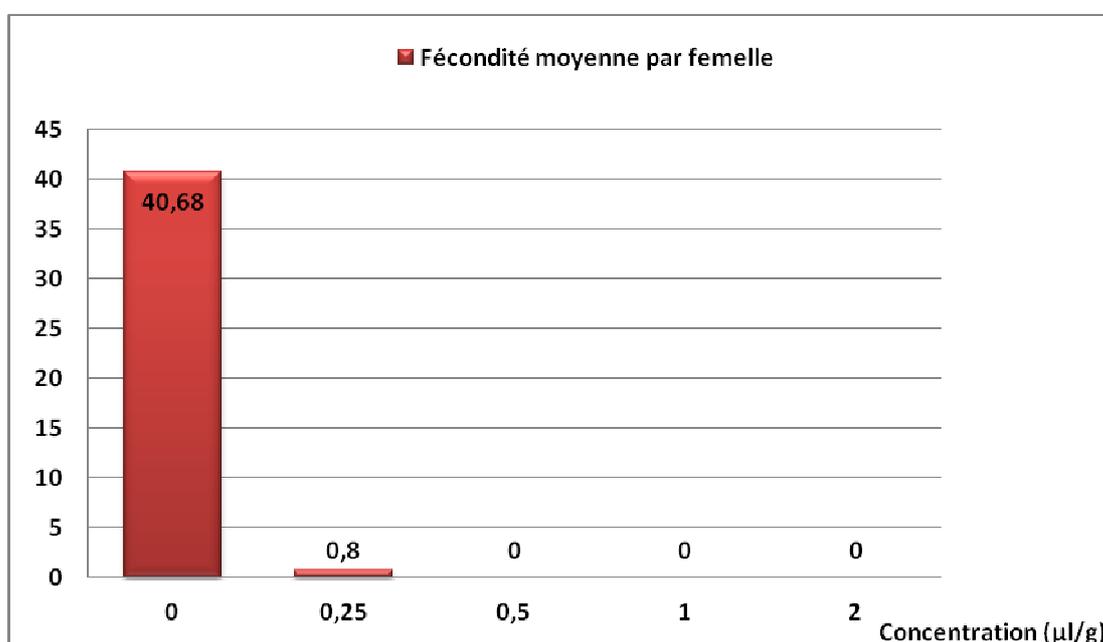


Figure 80: Nombre d'œufs pondus par femelle de *C. maculatus* traitée à l'huile essentielle de *L. stoechas* en fonction de la concentration

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 fortement baissé de 40,68 à 0,8 en utilisant l'huile de lavande à **0,25 µl/g**.

La figure 81 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.

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.

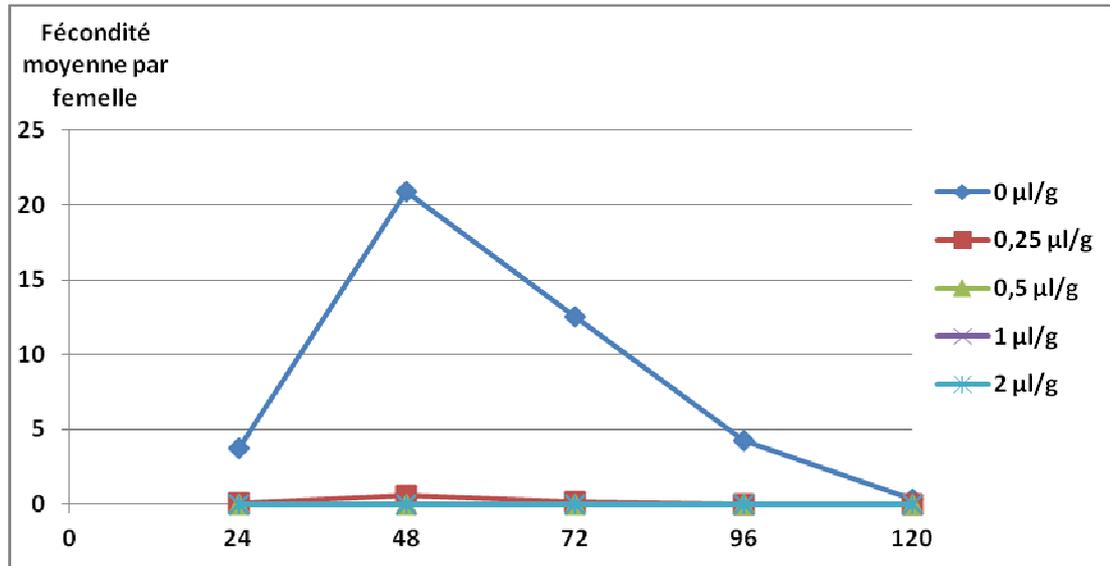


Figure 81: Evolution du nombre d'œufs pondus moyen par femelle de *C. maculatus* traitée à l'huile essentielle de lavande en fonction du temps.

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/cm²**, 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**). L'huile essentielle de *L. stoechas* peut être signalée comme un fort inhibiteur 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*.

4. Effet de l'huile essentielle sur la fertilité:

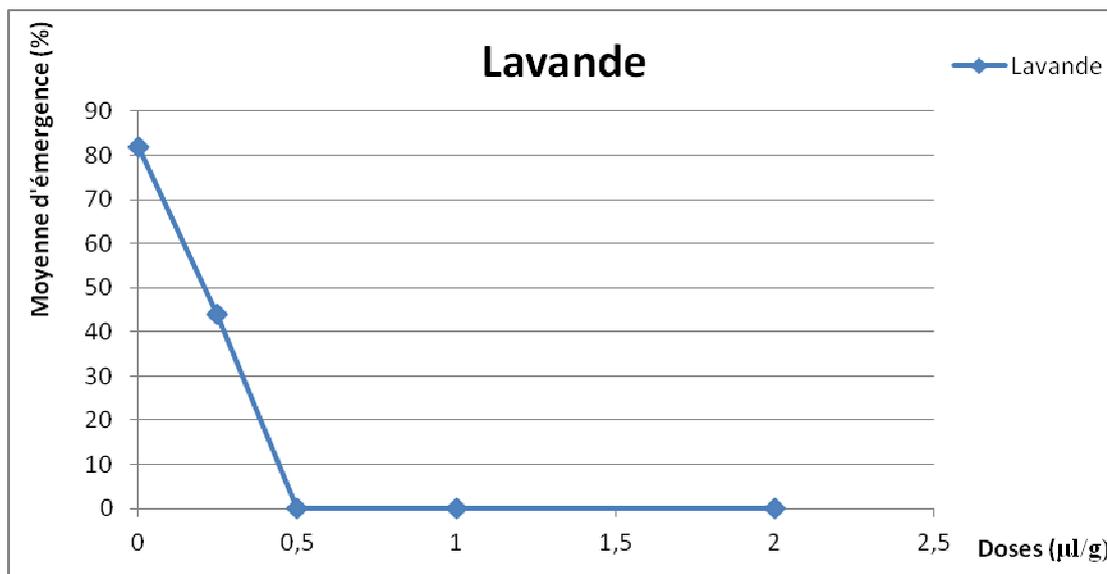


Figure 82: Variation du pourcentage moyen d'émergence de *C. maculatus* en fonction des doses de l'huile essentielle de lavande.

En général, on remarque que le taux d'œufs éclos diminue avec l'augmentation des doses utilisées. Pour le test témoin, le pourcentage d'émergence du ravageur est de **82%** (Figure 82)

Le pourcentage moyen d'éclosion a diminué de **82%** à **44%** avec la dose **0,25 $\mu\text{l/g}$** . Les concentrations plus élevées (**0,5 ; 1 et 2 $\mu\text{l/g}$**) ont permis de réduire ce pourcentage à zéro. L'huile essentielle de lavande possède un effet sur la fertilité très important. Nos résultats mettent en évidence que 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.

III. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et extraits étudiés :

L'estimation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits étudiés a été effectuée en réalisant deux tests qui se font sur un système modèle (*in vitro*) ne nécessitant pas l'utilisation d'un substrat biologique : la mesure de l'activité du piégeage du radical DPPH, et du pouvoir réducteur. Chaque activité a été comparée à celle d'un antioxydant de synthèse le **BHT** (Butyl Hydroxy Toluène) pris comme référence ou témoin positif.

1. Inhibition du radical DPPH :

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode au DPPH (**Leitão et al., 2002; Chen et al., 2004**). Ce radical libre stable (**DPPH[•]**) possède une coloration violette qui devient jaune pâle lorsqu'il est réduit (**DPPH-H**).

1.1. Huiles essentielles et extraits de *Juniperus phoenicea*:

➤ Cas des huiles essentielles:

Les résultats du test de piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles de *J. phoenicea* ainsi que pour le BHT sont regroupés dans le tableau 43.

Les huiles essentielles présentent une capacité de réduction du radical libre mais les concentrations requises pour l'inhibition de 50% des radicaux n'ont pas été déterminées car pour la concentration maximale de 1000 mg/L nous n'avons pas pu dépasser 15% d'activité. On remarque que l'huile extraite des feuilles de *Juniperus phoenicea* présente une activité de piégeage du DPPH similaire à celles obtenues à partir des fruits quelque soit leur mode d'obtention. L'utilisation des micro-ondes pour l'extraction des huiles essentielles leur a attribué une activité de piégeage de DPPH comparable à celle de l'huile hydrodistillée. En général, on peut dire que les huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ont manifesté de très faibles activités de piégeage de DPPH.

Tableau 43: Résultats du piégeage du radical DPPH par le **BHT** et les huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* extraites des Fruits (**Fr**), des feuilles (**Fe**) et des fruits par hydrodistillation assistée par microondes (**Fe MO**) :

Concentration en mg/L	Activité du piégeage du DPPH ^a en %			
	Fr	Fe	Fr MO	BHT
10	ND	ND	ND	31.40±0.70
20	ND	ND	ND	42.14±0.48
50	ND	ND	ND	62.49±0.69
100	2.99±0.28	8.18±0.63	4.82±0.65	73.15±0.85
200	3.72±0.47	9.07±0.58	5.9±0.23	80.63±0.32
400	4.09±0.64	11.27±0.33	6.75±0.41	84.75±0.52
600	5.19±0.15	12.87±0.47	7.42±0.35	86.35±0.52
800	5.83±0.41	13.46±0.47	7.91±0.37	88.81±0.27
1000	6.35±0.65	14.54±0.20	8.33±0.76	91.07±0.13

ND : Non déterminé.

^a : Valeurs en moyenne ± écart-type.

En général, les huiles essentielles des plantes étudiées présentent de faibles activités antioxydantes par rapport à celles du BHT quelque soit la partie végétale utilisée et la technique d'extraction. Ceci était prévisible dans la mesure où toutes ces huiles ne contiennent pas de composés phénoliques auxquels tous les auteurs s'accordent à leur attribuer une très forte contribution à l'activité antioxydante. Ainsi aucune des HE n'a atteint un pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH de 50% avec les concentration utilisées ; tandis que l'utilisation du BHT à une dose 27.99 ± 0.66 mg/l.

➤ **Cas de l'extrait des feuilles :**

Le tableau 44 résume les résultats de la mesure du pouvoir piégeage du radical DPPH de l'extrait des feuilles de *Juniperus phoenicea* :

Tableau 44: Résultats du test du pouvoir de piégeage du radical DPPH de l'extrait des feuilles de *Juniperus phoenicea* :

Concentrations en mg/l	Activité du piégeage du DPPH ^a en %	
	Extrait	BHT
0,5	9.20±0.91	ND
5	21.19±0.93	ND
10	39.80±0.78	31.40±0.70
20	69.58±0.66	42.14±0.48
50	88.94±0.12	62.49±0.69
100	89.22±0.67	73.15±0.85

^a Valeurs moyennes ± écart-type.

Comme on s'y attendait, l'extrait éthanolique des feuilles de *Juniperus phoenicea* a montré une grande activité d'inhibition du radical DPPH. Ainsi, pour 5 mg/L d'extrait nous avons obtenu une activité supérieure à celle obtenue pour 1000 mg/L avec les huiles essentielles.

Ceci peut être attribué à la teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait, qui sont d'excellents antioxydants dont les propriétés oxydo-réducteurs leurs permettent d'agir comme des agents réducteurs, donateurs d'hydrogène, et inhibiteurs de l'oxygène singulet et triplet (Pietta, 2000).

Tableau 45: Concentration pour 50% d'inhibition des radicaux libres pour l'extrait des feuilles de *Juniperus phoenicea* et pour le BHT.

	Extrait	BHT
IC ₅₀ en mg/l	9.81±0.07	27.99±0.66

IC₅₀: Concentration inhibitrice de 50% des radicaux.

Cet extrait s'est révélé plus efficace (IC₅₀ = 9.81±0.07 mg/l) que le BHT (IC₅₀ = 28±0.66 mg/l). Les résultats présentés ci-dessus sont en accord avec ceux de **Djeridane et al. (2006)**.

1.2.Huile essentielle et extrait de Lavande :

➤ Cas de l'huile essentielle:

Les résultats du test de piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles et par le BHT sont regroupés dans le tableau 46.

Tableau 46: Test du pouvoir de piégeage du radical DPPH du BHT et de l'huile essentielle de lavande.

Concentration en mg/l	Activité du piégeage du DPPH ^a en (%)	
	HE de <i>L. stoechas</i>	BHT
10	ND	31,40±0,70
20	ND	42,14±0,48
50	ND	62,49±0,69
100	4,88±0,72	73,15±0,85
200	7,53±0,06	80,63±0,32
400	11,03±0,13	84,75±0,52
600	14,41±0,51	86,35±0,52
800	16,74±0,12	88,81±0,27
1000	19,69±1,29	91,07±0,13

ND : Valeur non déterminée.

^a: 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** (Tableau 46). 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**.

➤ **Cas des extraits :**

Les résultats du test de piégeage du radical DPPH par l'extrait et par le BHT sont regroupés dans le tableau 47.

Tableau 47: Résultats du test du pouvoir de piégeage du radical DPPH par le BHT et l'extrait de la lavande.

Concentration (mg/l)	Activité du piégeage du DPPH ^a (%)	
	Extrait de <i>L. stoechas</i>	BHT
2	9,36±0,72	ND
5	11,84±0,26	ND
10	24,46±0,87	31,40±0,70
20	45,91±0,82	42,14±0,48
50	87,69±0,75	62,49±0,69
100	89,21±0,49	73,15±0,85

ND: Valeur non déterminée.

^a: Valeurs en moyenne ± écart-type.

La même proportionnalité entre le pouvoir d'inhibition du radical DPPH et la dose pour le BHT et l'huile essentielle a pu être détectée pour l'extrait étudié. Ainsi, l'extrait éthanolique de la lavande a montré une capacité élevée à réduire le DPPH par rapport à celle de l'huile essentielle issue de la même plante et a 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.

La détermination des concentrations inhibitrices de 50% des radicaux a permis de classer les antioxydants utilisés selon leurs efficacités (Figure 83). La substance qui possède une valeur de IC_{50} plus faible a le pouvoir de piégeage le plus élevé.

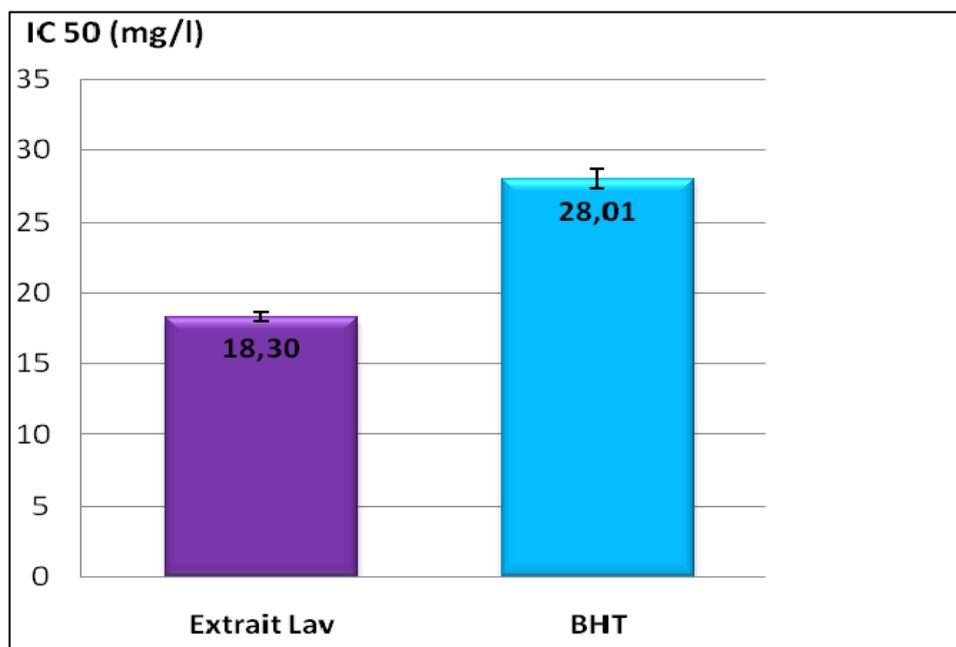


Figure 83: Concentrations pour 50% d'inhibition des radicaux libres du BHT et de l'extrait de *L. stoechas*.

L'extrait lavande s'est avéré le très efficace ($IC_{50}= 18,30\pm 0,31$ mg/l) et possède une capacité réductrice plus importante que celle du BHT ($IC_{50}= 28,01\pm 0,66$ mg/l).

Le fort pouvoir antioxydant des extraits 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'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.

1.3. Huile essentielle et extrait de d'aneth :

Les résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH par l'HE d'*Anethum graveolens* ainsi que celle du BHT sont représentés dans le tableau 48.

Tableau 48: Activité de piégeage du radical DPPH par l'HE d'aneth et le BHT

Concentration en mg/l	Activité du piégeage du DPPH ^a (%)	
	HE aneth	BHT
500	5.35 ± 0.11	73.15 ± 0.85
1000	6.61 ± 0.22	91.07 ± 0.12
1500	10.07 ± 0.15	ND
2000	10.36 ± 0.06	ND
4000	11.92 ± 0.17	ND

^a Les résultats sont moyennes ± écart type de trois mesures.

ND : Non disponible

Les profils d'activité anti-radicalaire obtenus révèlent que le l'HE d'aneth possède une activité anti-radicalaire dose dépendante. Le pouvoir de piégeage du radical DPPH par l'HE d'*A. graveolens* a été établi puisqu'ils sont quand même capables de réduire la forme stable du radical DPPH. Ce pouvoir de piégeage augmente proportionnellement avec la concentration de ces huiles.

Les concentrations inhibitrices de 50% des radicaux sont données dans le tableau 49.

Tableau 49: Concentration nécessaire pour inhiber 50% des radicaux libres par l'HE d'*Anethum graveolens* et le BHT.

	Aneth	BHT
^b IC ₅₀	ND	28.00 ± 0.66

^bIC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50% des radicaux.

ND : Non déterminé.

La concentration requise pour la neutralisation et la stabilité de 50% de la concentration du DPPH n'a pas été atteinte, étant donné qu'à la plus forte concentration (4000 mg/l), le taux d'inhibition ne dépasse pas les 24% (**Tableau**). De manière générale, on peut dire; les HE testées présentent un faible effet « scavenger » du radical DPPH.

- L'HE d'aneth a montré une activité de piégeage du radical DPPH très faible quelque soit la concentration utilisée, à la plus grande concentration (4000 mg/l) on remarque un pouvoir de piégeage du radical DPPH qui ne dépasse pas les 12%.
- A fin de comparer nos valeurs enregistrées pour le test de piégeage du radical DPPH avec celle de la littérature scientifique; nos recherches n'ont finalement abouti que sur très peu d'études, qui pour la plupart rapportent les propriétés biologiques bien connues de l'aneth : à savoir ; les effets antioxydants (**Satyanarayana et al., 2004 et Singh et al., 2006**) et anti-cancer de l'aneth (**Zheng et al., 1992**).

2. Pouvoir réducteur:

Dans ce test l'estimation de l'activité antioxydante consiste en une évaluation de l'aptitude des huiles essentielles et de l'extrait à réduire le fer ferrique. Le BHT a été pris comme antioxydant de référence. 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.

2.1.Huile essentielle et extrait de genévrier :

➤ Cas des huiles essentielles:

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur des huiles essentielles et du BHT sont représentés dans le tableau 50.

Les huiles essentielles extraites de *Juniperus phoenicea* présentent un faible pouvoir réducteur par rapport à celui du BHT. L'huile essentielle des feuilles présente toujours un pouvoir réducteur supérieur à celui des huiles obtenues à partir des fruits quelque soit leur mode

d'extraction. L'huile essentielle obtenue par ESSAM a manifesté un pouvoir réducteur inférieur à celui obtenu avec l'huile extraite par HD.

Tableau 50: Résultats du test du pouvoir réducteur du **BHT** et des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* extraites des Fruits (**Fr**), des feuilles (**Fe**) et des fruits par hydrodistillation assistée par microondes (**Fe MO**).

Concentrations en mg/L	Absorbance ^a à 700 nm			
	Fr	Fe	Fr MO	BHT
100	0.162±0.017	0.205±0.012	0.102±0.016	0.863±0.001
200	0.252±0.042	0.296±0.017	0.190±0.018	1.063±0.024
400	0.317±0.033	0.313±0.014	0.206±0.027	1.161±0.008
600	0.343±0.027	0.328±0.021	0.213±0.014	1.178±0.005
800	0.356±0.043	0.348±0.037	0.225±0.008	1.218±0.036
1000	0.373±0.023	0.406±0.013	0.242±0.014	1.303±0.003

^a Valeurs en moyenne ± écart-type.

- **Cas de l'extrait des feuilles :**

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur de l'extrait des feuilles de *Juniperus phoenicea* et du BHT sont représentés dans le tableau 51 :

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur de l'extrait des feuilles viennent confirmer ceux obtenus avec le test de piégeage du radical DPPH; l'extrait a présenté un fort pouvoir réducteur par rapport à celui du BHT. Même à de faibles doses (**0.5 et 5mg/l**) l'extrait possède toujours un pouvoir réducteur considérable.

Tableau 51: Résultats du test du pouvoir réducteur de l'extrait des feuilles de *Juniperus phoenicea* :

Concentrations en mg/L	Absorbance ^a à 700 nm	
	Extrait	BHT
0,5	0.039±0.005	ND
5	0.083±0.006	ND
10	0.148±0.006	ND
20	0.609±0.043	0.311±0.006
50	1.048±0.013	0.576±0.001
100	1.804±0.043	0.863±0.011

^a Valeurs moyennes ± écart-type.

2.2. Huile essentielle et extrait de Lavande :

Le tableau 52 illustre les résultats du pouvoir réducteur de l'huile essentielle de *L. stoechas* ainsi que celui du BHT. Les pouvoirs réducteurs de l'huile essentielle et du BHT sont proportionnels aux concentrations utilisées.

Pour l'huile essentielle de lavande, sa capacité réductrice est significativement faible par rapport à celle du BHT. La quasi-absence des composés phénoliques dotés de forts pouvoirs réducteurs, dans le profil aromatique des huiles pourrait expliquer ces résultats.

Tableau 52: Pouvoir réducteur du BHT et de l'huile essentielle de *L. stoechas*.

Concentration (mg/l)	Absorbance ^a à 700 nm	
	HE de <i>L. stoechas</i>	BHT
100	0,031±0,004	0,863±0,011
200	0,106±0,019	1,063±0,024
400	0,166±0,005	1,161±0,008
600	0,204±0,005	1,178±0,005
800	0,292±0,002	1,218±0,036
1000	0,205±0,025	1,303±0,003

^a: Valeurs en moyenne ± écart-type.

➤ **Cas de l'extrait :**

Le tableau 53 montre les résultats le pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique étudié comparé à celui du BHT.

Tableau 53: Pouvoir réducteur du BHT et de l'extrait de *L. stoechas*.

Concentration (mg/l)	Absorbance ^a à 700 nm	
	Extrait de <i>L. stoechas</i>	BHT
2	0,014±0,005	ND
5	0,025±0,005	ND
10	0,056±0,006	ND
20	0,132±0,002	0,311±0,006
50	0,338±0,019	0,576±0,001
100	0,739±0,035	0,863±0,011

^a: Valeurs en moyenne ± écart-type

Les résultats du tableau 56 montrent que les extraits sont nettement plus efficaces que les huiles essentielles obtenues à partir des mêmes plantes et agissent à de faibles doses (tableau).

Le BHT reste l'antioxydant ayant le pouvoir réducteur supérieur à celui des deux extraits (tableau). Les pouvoirs réducteurs de l'extrait de *L. stoechas* 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**.

2.3. Huile essentielle de l'aneth :

Le pouvoir réducteur mesure la capacité des HE d'*Anethum graveolens* à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Le BHT a été pris comme antioxydant de référence. Donc, ce test mesure de l'aptitude d'une huile essentielle à interagir avec les espèces chimiques réactives en tant que donneur d'électrons tels que les radicaux libres. Ces radicaux ainsi réduits deviennent plus stables. Les résultats du pouvoir réducteur de l'HE étudiée et du BHT exprimés par l'absorbance à 700 nm, sont résumés dans le tableau 54.

Tableau 54: Pouvoir réducteur du BHT et de l'huile essentielle d'Aneth

Concentration en mg/l	^a Absorbance à 700 nm	
	HE d'aneth	BHT
500	0.450 ± 0.037	1.17 ± 0.01
1000	0.710 ± 0.004	1.30 ± 0.03
1500	0.750 ± 0.035	ND
2000	0.790 ± 0.013	ND
4000	0.900 ± 0.011	ND

^a Moyennes ± écart type de trois mesures.

ND : Non disponible

D'après le tableau 57, on remarque que les HE étudiées présentent un faible pouvoir réducteur par rapport à celui du BHT, mais croit proportionnellement avec l'augmentation de la concentration. La capacité réductrice de l'HE d'*A. graveolens* est visiblement inférieure à celle de l'antioxydant de synthèse quelque soit la concentration utilisée. L'absence ou la faible teneur en composés phénoliques (tels que le carvacrol et/ou le thymol) explique probablement cette faible capacité réductrice. Ces composés connus pour leur pouvoir réducteur sont appelés reductones. Ils sont capables de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}), céder des électrons et transformer les radicaux libres actifs en produits stables (**Dorman et al., 2004, Singh et al., 2006**).

Conclusion générale

Conclusion générale :

Ce travail a visé l'analyse phytochimique des différents organes de l'érigéron, (*Conyza canadensis*), du fenouil commun (*Foeniculum vulgare*), de la lavande (*Lavandula stoechas*), et du genévrier (*Juniperus phoenicia*) en exploitant des techniques performantes d'extraction, de purification et d'analyse. Les extraits végétaux et molécules isolées ont été valorisés au niveau biologique, notamment en tant qu'agent antioxydants et insecticides.

Le travail a été organisé selon trois volets:

1. La réalisation des extraits volatils par hydrodistillation et hydrodistillation assistée par microondes, et des extraits non volatils par Soxhlet.

2. Travail de caractérisation des extraits, axé en partie sur l'utilisation de méthodes couplées d'analyse (CPG et CPG/SM) qui permettra d'identifier rapidement les classes chimiques présentes ainsi que les extraits susceptibles de contenir des métabolites possédant une structure originale en plus d'une purification et d'identification de quelques métabolites secondaires d'intérêt.

3. Criblage d'activité biologique des extraits réalisés à travers une série d'applications antioxydantes, antimicrobienne et insecticides des extraits.

La suite de notre travail a eu comme objectif d'étudier l'impact des différents paramètres sur la variabilité chimique et l'activité biologique des extraits étudiés.

➤ Pour élucider le rôle de la méthode d'extraction sur le rendement, la qualité olfactive, la composition chimique et le pouvoir antioxydant des huiles essentielles, une étude comparative a été effectuée sur les fruits (baies) de *Juniperus phoenicea* L. récoltées à Sétif. Le choix de cet organe est justifié par le rendement élevé en HE ce qui facilite l'étude de la cinétique d'extraction et offre une quantité suffisante pour un criblage complet de la composition chimique de l'huile essentielle.

➤ Différents travaux de recherche ont rapporté une différence importante entre les HE obtenues à partir de différents organes de la même plante aromatique; les résultats de notre travail supportent ça. Cette différence a été mise en évidence pour les différents organes de l'aneth (Feuilles, tiges, fruits, fleurs) et le genévrier (Fruits et feuilles), les différences

détectées sont considérable du point de vue composition chimique et activité antioxydante, insecticide et antimicrobienne).

Les résultats obtenus à l'issue de cette étude concernent en premier lieu l'évaluation du potentiel phytochimique d'extraits des plantes étudiées à travers les tests de détection des activités biologique ont amené les résultats les plus prometteurs, en effet ils ont montré un effet protecteur des huiles essentielles et extraits obtenus contre les facteurs de détériorations des produits alimentaires ainsi qu'un potentiel de leurs utilisation dans la formulation d'agent alternatif aux produits chimiques de synthèse.

Le deuxième volet de ce travail a permis de démontrer une variabilité importante des profils chimiques et des activités biologiques des extraits étudiés selon les différents paramètres étudiés. Ainsi la méthode d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes a permis d'obtenir des rendements comparables à ceux réalisés par des procédures classiques tout en gardant un effet antioxydant similaire; l'avantage de cette méthode réside dans le temps d'extraction sensiblement réduits et à une consommation moins importante d'énergie. Le changement d'un seul paramètre (origine, organe utilisé ou stade de maturité de la plante à la récolte) conduit à des changements remarquables dans la composition chimique et pouvoir biologique des produits volatils et non volatils étudiés.

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.

➤ 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.

- L'huile essentielle de *L. stoechas* a présenté un fort pouvoir insecticide contre *Callosobruchus maculatus*, un coléoptère causant des dégâts importants sur les denrées alimentaires stockées.

- Cet extrait a 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 des plantes étudiées, 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 anticancéreuse et anti-acétylcholinestéase des huiles essentielles et extraits éthanoliques.

Références bibliographiques:

Abdel-Sattar E., Zaitoun A.A., Farag M. A., El Gayed S. H., Harraz F. M., 2009. Analyst, vol.127, p.183.

Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras t. et Arsenakis M. (1998). Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. Journal Agriculture Food Chemistry, vol.46, n.6, p.p.1739-1747.

AFNOR, 2000. Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, Paris.

Alizadeh A., Alizadeh O., Sharafzadeh S.H., Mansoori S., 2011. Effect of different ecological environments on growth and active substances of garden thyme. Adv. Envir. Bio., vol. 5, p.p. 780-783.

Alizadeh A., Shaabani M., 2012. Essential Oil Composition, Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activity in *Salvia officinalis* L. Cultivated in Iran. Advances in Environmental Biology. Vol. 6(1), p.p. 221-226.

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.

Anton R., Lobstein A., 2005. Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris, Lavoisier, 522p. (Technique et Documentation)

Arnaud P., 1985. Cours de chimie organique. Ed. bordas, Paris.

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.

Baba Aissa F., 1999. Encyclopédie des Plantes Utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb ; Ed : LIBRAIRIE MODERNE – ROUIBA ; p.p.243-244.

Babri R.A., Khokhar I., Mahmood Z., Mahmud S., 2012. Chemical composition and insecticidal activity of the essential oil of *Anethum graveolens* L. *Sci.Int. (Lahore)*, vol. 24(4), p.p.453-455.

Bachelot C., Blaise A., Corbel T. Le Guernic A., 2006. Les huiles essentielles. Licence 2 Biologie, Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord, France, 26p.

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.

Banthorpe D.V., Charwood B.V., 1972. Chemistry of terpènes and terpenoïdes. Ed.A.A. New man Academic Press, London and New York, p.p.337-374.

Baratta M.T., Dorman H.J.D., Deans S.G., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Ruberto G., 1998. Antibacterial and anti-oxidant properties of some commercial essential oils. *Flav. Frag. J.*, vol. 13, p.p. 235-244.

Barrett P., 1996. Growing and using lavender. A Storey Country Wisdom Bulletin. US.

Bärtels A., 1997. Guide des Plantes du Bassin méditerranéen. Editions Ulmer.

Bartosz G., 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. Vol.9, p.p.5-21.

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.

Belaiche P., 1979. L'aromatogramme : traité de phytothérapie et d'aromathérapie, Tome 1. M. S. A. Editeur, Paris, 204p.

Belkassam A., Zellagui A., Gherraf N., Lahouel M., Rhouati S., 2011. Essential Oil Composition of Algerian *Ruta Montana* (Clus.) L. and its Antibacterial Effects on Microorganisms Responsible for Respiratory Infections. Advances in Natural and Applied Sciences, vol 5(3), p.p. 264-268.

Benhabiles N.E., 1995. Comparaisons des huiles essentielles de deux espèces Algériennes de romarin : extraction et étude analytique. Thèse magister, ENP, Alger.

Beniston N.T., Beniston W.S., 1984. Fleurs d'Algérie. Ed. Entreprise nationale du livre, Alger, 359p.

Bennett J V., Brodie J.L., Benner E.J., Kirby W.M.M., 1966. Simplified accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. Application of Microbiology, vol.14, p.p.170-177.

Berlette B.S., Stadtman E.R., 1997. Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. The Journal of biological chemistry., vol. 272, p.p. 20313-20316.

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.

Bernarth J., Danos B., Hethelyi E., 1991. Herba Hung, p.p. 30-35.

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.

- 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.
- Bezanger B.L., Pinkas M., Torck M., 1976.** Les Plantes Dans La Thérapeutique Moderne, Maloine, Paris.
- Bezanger B.L., Pinkas M., Torck M., 1986.** Les Plantes Dans La Thérapeutique Moderne, 2^{ème} Ed.
- 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.
- Bonnier G., 1999.** La Grande Flore en Couleur; Ed : BELIN; Tome 3; p.p.205-206.
- Bossard R. et Cuisance P., 1981.** Arbres Et Arbustes D'ornement Des Régions Tempérées Et Méditerranéennes, Paris, France.
- Bouaziz M., Thabèt Yangui T., Sayadi S., Dhouib A., 2009.** Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. Food and Chemical Toxicology. Vol. 47, p.p. 2755-2760.
- Bouchiki T., 1994.** Activités antimicrobiennes de quelques huiles essentielles. Thèse de doctorat, université Blaise Pascal, Clermont Ferrand.
- Bouchra C., Achouri M., Idris si hassani L.M. et Hmamouchi M., 2003.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea*. Journal of Ethnopharmacology, vol. 89, P. 165-169.
- Bourgeois C. M., Mescle J. F. et Zucca J., 1996.** Microbiologie alimentaire: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed. Tee. et Doc., Paris. 672 p. (Sciences et techniques agroalimentaires).
- Boutekdjiret 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.
- Bowles B.L., Sackitey S.K., Williams A.C., 1995.** Inhibitory effects of flavour compounds on *Staphylococcus aureus* WRRC B124. L Food Saf., vol. 15, p.p.337-347.
- Bown D., Hawthorne L., 1997.** Plantes aromatiques et médicinales. p.48-50.

- Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S., McAnalley B., 2003.** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. GlycoScience & Nutrition. vol.4, n.6, 7p.
- Brown L., Downhower J.F., 1988.** Analyses in Behavioral Ecology: A Manual for Lab and Field. Sinauer Associates, 194 p.
- Bruneton J., 1987.** Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Ed. Technique et Documentation - Lavoisier, Paris, 585p.
- 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
- Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- A review. International Journal of Food Microbiology, vol. 94, p.p.223–253.
- Burton G.W., Traber M.G., Acuff R.V. et al. 1998.** Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentration in response to supplementation deuterated natural and synthetic vitamin E. Am J Clin Nutr.vol. 64, p.p. 669-684.
- Caillard J., 2003.** Les plantes, des usines chimiques en miniature. Dossier de ressources documentaires. CRDP Midi-Pyrénées, 6p.
- Caillet S., Lacroix M., 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Science Appliquée à l'Alimentation (RESALA) INRS- institut Armand-Frappier, Université de LAVAL (Québec).
- Callan W., Johnson D. L., Westcott M. P., Weity L. E., 2007.** Herb and oil composition of dill (*Anethum graveolens* L): effects of crop maturity and plant density. Ind. Crops Products. vol. 25, p.p. 282–287.

Campanili E., 1998. Dictionnaire de la phytothérapie et des plantes médicinales. Techniques Nouvelles. p.421-424.

Canillac N., Mourey A. 1996. Comportement de l'Esteria en présence de l'HE de sapin et de pin. Sei. Aliments, vol.16, p.p.403-411.

Capon M., Courilleau V. et Valette C., 1993. Chimie des couleurs et des odeurs. Ed. Cultures et techniques, Nantes. 255 P. (Formation).

Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (teatree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob. Agents Chemother. Vol.46, p.p.1914-1920.

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., Martín-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.

Cédric B., Nicolas F., Claude M., 2003. A new coumarin glucoside, coumarins and alkaloids from *Ruta corsica* roots. Fitoterapia. vol.75 (2), p.p.242-244.

Chahardehi A.M., Ibrahim D., Sulaiman S.F., 2010. Antioxidant, antimicrobial activity and toxicity test of pileamicrophylla. International Journal of Microbiology, Article ID 826830, 6p.

Chao S. C., Young D. G., Oberg G.J., 2000. Screening for inhibitory activity of Essential Oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. J. Essent. Oil Res., vol.12, p.p. 639-649.

Chavanne M. 1986. Chimie organique experimentale. Ed. Morula, Berlin.

Cheftel H., Cheftel J.C., 1977. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. vol.1. Edition Lavoisier, Paris, p.381.

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.

Clevely A., Richmond K., 1997. Plantes Et Herbes Aromatiques, Connaître Et Préparer, Larousse Paris.

Conner D.E., 1993. Naturally occurring compounds: Antimicrobials in foods. New York, Davidson In. P. & Branen A.L., 468p.

Couladis M., Tzakou O., Mimica-Ducki Y.N., Janic R., Stojanovic D., 2002. Flavour. Frag. J. 17, 119p.

Cowan M. M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, n.4, vol.12, p.564–582.

Cox S. D. et Mann C. M., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology, Vol. 88, n.1, p.p.170-175.

Croguennec T. et al., 2006. Science des aliments: Stabilisation biologique et physico-chimique. Paris, Lavoisier, 382p. (Technique et Documentation).

Cronquist A., 1968. The Evolution and Classification of Flowering Plants, 396p.

Crouzet J., 1998. Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés, p1-18p.

Cuendet M., Hestettmann K., Potterat O., 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fragariae blumei*. Helvetica Chemica Acta, vol. 80, p.p. 1144-1152.

Daly H.V., Doyen J.T., Purcell A.H., 1998. Introduction to Insect Biology and Diversity, 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford, New York.

De Jussieu A.L., 1789. *Genera Plantarum*, 296p.

De Maak F., Sablier M., 1999. Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Techniques de l'ingénieur, Traité Analyse et Caractérisation, PE 2614, 18p.

- Deans S.G. et Ritchie G., 1987.** Antimicrobial proprieties of plants essential oils. Journal of food microbiology, vol. 5, p.p.165-180.
- Decker E.A., Xu Z., 1998.** Minimising ranciditu in miscle food. Food technology, vol. 52, p.p.54-61.
- 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.
- Delamare A.P.L., I.T. Moschen-Pistorello, L. Artico, L. Atti-Serafini, and Echeverrigaray S., 2007.** Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. Food Chem., vol 100, p.p. 603-608.
- Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G., 2002.** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils, International Journal of Food & Microbiology, vol 74, pp.101-109.
- 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.
- Deshpande S. S., Deshpande U. S., Salunkhe D. K., 1995.** In Food Antioxidants, New York, Basel, Hong Kong, 361p.
- Desjobert J.M., Bianchini A., Tomi P., Costa J., Bernardini A.F., 1997.** Analisis Mag., vol. 25(6), 13p.
- Djerroumi A. et Nacef M., 2004.** 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed Palais du livre. p.p.135-131.
- Dob T., Dahmane D., Gauriat-Desrdy B., Daligault V., 2008.** Volatile Constituents of the Essential Oil of *Ruta chalepensis* L. subsp. *Angustifolia* (Pers.) P. Cout. The Journal of essential oil research, vol.20, n.4, p.p.306-309.
- Dodt K.C., 1996.** The Essential Oils Book (Creating Personnel Blends For Mind and Body); Ed: STOREY BOOKS; p.p.21-52.

- Doerper S., 2008.** Modification de la synthèse des furo-Coumarines chez *Ruta graveolens* L. par une approche de génie métabolique ; Thèse de Nancy – Université, INRA ; p.p.12-34.
- Dorman D.H.G., Bachmayer O., Kosar M. et Hiltunen R., 2004.** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Tuekey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 52, p.p. 762-770.
- Dormans H. J. Deans S J., 2000.** Antimicrobial agent from plants: antibacterial activity of plants volatil oils. J. ofappl. Microbial. vol.88, pp. 308-316.
- Dubey V.S., Bhalla. Ret Luthra R., 2003.** Sucroze mobilisation in relation to essential oil biogenesis during palmarosa inflorescence development. J. Biosci., vol. 28, n.4, pp.479-487.
- Duling E.N., Owen J.C., John B.G., Rosmary F.W., Kevin A.M., Yeap L.F., Nigel B.P. 2007.** Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixture. Food chemistry, vol. 101, p.p. 1417- 1424.
- Dung N.T., Kim J.M., Kang S.C., 2008.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology, vol. 46, p.p.3632-3639.
- Durande, 1782.** Notions Elémentaires de Botanique, 284p.
- 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.
- Ela M.A., El-shaer N.S., et Ghanem N.B., 1996.** Antimicrobial evaluation and chromatographie analysis of some essential and fixed oils. Pharmazie, Vol. 51, p.p. 993 - 995.
- Elbadry E. A., Ahmed M. Y. Y., 1975.** Effects of gamma radiation on the egg stage of southem cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* F. Entomology, vol.79, p323-328.
- 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.
- Ernes S., 1995.** Arbres, Arbustes Et Arbrisseaux en Algérie, Offices des publications universitaires-Alger-Ed., 686p.
- Esiyok D. et al., 2004.** Herbs as a Food Source in Turkey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. n.5, p.334-339.
- Eymard R., 2003.** Mise en evidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservatio et de la transformatio du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procedes. These Doctorat, Universite de Nante, France.
- 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.
- Fakhfakh N., Zouari S., Zouari M., Loussayef C., Nacim Zouari N., 2012.** Chemical composition of volatile compounds and antioxidant activities of essential oil, aqueous and ethanol extracts of wild Tunisian *Ruta chalepensis* L. (Rutacea). *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol. 6(4), pp. 593-600.
- Farhat A., 2010.** Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, 136p.
- Fauchère J. L. et Avril J.L., 2002.** Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipses, Paris. 365 P.
- Favier A., 2003.** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. p.p.108-115.
- Feng W. et Zheng X., 2007.** Essential oils to control *Alternaria alternaria* *in vitro* and *in vivo*. *Food Control*, vol. 18, p.p. 1126-1130.
- 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.
- Filliat P., 2012.** Les plantes de la famille des Apiaceae dans les troubles digestifs. Faculté de Pharmacie de Grenoble, 129p.
- 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^{ème} partie : les résultats. Bulletin technique d'information du Ministère de l'Agriculture. n.349, p.271-280.

Forment M., Roques H., 1941. Répertoire des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie, Ed. OFALAC, 59p.

Fouché J. G., Marquet A., Hambuckers A., 2000. Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman.

Frontquer P., 1962. Plantes Médicales El Discorides Renovado, Ed Hebon S.A Barcelona, 426p.

Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chem., vol. 102, p.p.898-904.

Gakuru S., Foua-Bi K., 1995. Compared effetct of four plant essential oils against cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* F. and rice weevil L. tropicultural. 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.

Garneau F-X., 2005. Le materiel vegetal et les huiles essentielles. Huiles essentielles: de la plante à la commercialisation. Manuel pratique : Ed. Corporation la seve. Universite de Chicoutimi, Québec.

Garnero J., 1996. Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur, Traité Constantes physicochimiques, K345, 39p.

- Garnero J., 1996.** Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur, p.p.1-45.
- 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.
- Ghrib A., 1995.** Etude comparative des huiles essentielles de menthe poussant en Algérie. Thèse de magister, chimie organique, USTHB.
- Giamperi I., Fraternele D., Ricci D., 2002.** The in vitro action of essential oils on different organisms. Journal of essential oil Research Journal of the american oil chemists Society. vol.55, p.p.312-318.
- Gil M.I., Thomâs-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M. et Kader A.A., 2000.** Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, J. Agric. Food Chem., Vol.48, p.p.4581-4589.
- 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.
- Grella, G.E., Picci V., 1988.** Variazioni stagionali dell'olio essenziale di *Salvia officinalis*. Fitoterapia. vol. 59, p.p. 97-102.
- Grundschober F., 1991.** The identification of individual components in flavorings and flavoured foods, Lebensm Unters Forsch, vol.192, p.530-534.
- Guenther E., 1972.** The essential oils. New York, Ed Robert Krieger publishing co. vol. 3.
- Guenther E., 1974.** The essential oils. Edition: Robert Krieger publishing co Huntington, New York, vol.3, p.777.

- Gueorguiv E., 1980.** Technologie des produits aromatiques. Ed. Plovdiv.
- 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).
- Guiraud J.P., 2003.** Microbiologie Alimentaire. Ed. Dunod, Paris, 652 P.
- Gulcin I., Sat I. G., Baydemir S., Elmastas M., Kufrevioglu O. I., 2004,** Food Chemistry. vol.87, p.393.
- Gunston F., Norris F., 1983.** In: lipids in Food- Chemistry. Biochemistry and Technology Pergamon Press, p.p.161-165.
- Gürsoy N., Tepe B. and Akpulat H.A., 2012.** Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Salvia palaestina* (Bentham) and *S. ceratophylla* (L.). Records of Natural Products, vol. 6(3), p.p. 278-287.
- Hadi M., 2004.** La quercétine et ces dérivés : molécule à caractères pro oxydant ou capteur de radicaux libres ; étude et application thérapeutiques. Thèse de doctorat, Univesité de Louis Pasteur, domaine : Pharmacochimie, 155p.
- Halliwell B., Gutteridge. J. M. C., 1999.** In Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science: Oxford, 36p.
- Halliwell, B., Whiteman, M., 2004.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? British journal of pharmacology. vol. 142, p.p.31-2.
- Hans W.K. 2007.** 1000 plantes aromatiques et médicinales. *Terre édition*
- Harborne J.B., 1989.** General procedures and measurement of total phénolics 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.
- Haznedaroglu, M.Z., Karabay N.U., Zeybek U., 2001.** Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil, *Fitoter.*, vol.72, p.p. 829-831.
- 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.
- Hellal Z., 2001.** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magister en biologie, université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, 120p.
- 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.
- Heywood V.H., 1996.** Les plantes à Fleurs, Ed. Nathan, Paris.
- 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.

- Ho C.L., Wang E.I.C., Su Y.C., 2009.** Essential oil compositions and bioactivities of the various parts of *Cinnamomum camphora* Sieb. var. *linaloolifera* Fujuta. 林業研究季刊. vol. 31(2), p.p. 77-96.
- Hoet, S., Stevigny, C., Herent, M. F., Quetin-Lecleroq, J. 2006.** Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med.*, vol.72, p.p.480-482.
- 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.
- Hong Z., Jun T., Yuechen Z., Xiaoquan B., Jingsi Z., Yehong M., Youwei W., 2011.** In Vitro and In Vivo Activities of Essential Oil from the Seed of *Anethum graveolens* L. against *Candida* spp., Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, p.p.1-8.
- 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.
- Hulin V., Mathot A.G., Mafart P., et Dufosse L., 1998.** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, vol.18, p.p. 563-582.
- Hussain A. I., Anwar f., Iqbal T., Bhatti I. A., 2011.** Antioxidant attributes of four lamiaceae essential oils. *Pak. J. Bot.* Vol. 43(2), p.p. 1315-1321.
- Ibañez E., Kubátová A., Señoráns F. J., Cavero 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.
- Ibañez E., Cifuentes A., Crego A. L., Señoráns F. J., Cavero 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.
- Ilboudo 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.

Isopencu G., Ferdes M., 2012. The effet of *Anethum graveolens* upon the growth of *E.coli*. U.P.B. Sci. Bull., Serie B. vol. 74 (3), p.p. 85-92.

Ivanova A., Kostova I., Rodriguez Navas H., Villegas J., 2004. Volatile Components of Some Rutaceae Species. Z. Naturforsch., vol. 59, p.p.169-173.

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.

Jalsenjak, V., Peljnajak, S., Kustrak, D., 1987. Microcapsules of sage oil, essential oils content and antimicrobial activity. Pharmazie, vol. 42, p.p. 419-420.

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 Peditary n.164, p.520-522.

Jay J.M., Rivers G.M. 1984. Antimicrobial activity of some food flavouring compounds. J. Food saf. vol.6, p.p. 129-139.

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, Siemens 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.
- Jukić M. et Miloš M., 2005.** Catalytic Oxidation and Antioxidant Properties of Thyme Essential oils (*Thymus vulgarae* L.). *Croatica Chemica Acta*. Vol. 78(1), p.p. 105-110.
- Jung T., Bader N., Grune T., 2007.** Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.vol.462, p.p.231-237.
- Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z. et Benlabed K., 2005.** Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*, vol. 15, p.p.129-133.
- Kalemba D., Kunicka A., 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem*. Vol. 10, p.p. 813-829.
- Kamatou G.P.P., Van Vuuren S.F., Van Heerden F.R., Seaman T., Viljoen A.M., 2007.** Antibacterial and antimycobacterial activities of South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. chamelaeagnea*, *South African J. Botany.*, vol.73, p.p. 552-557.
- Kambouche N., Merah B., Bellahouel S., Bouayed J., Dicko A., Derdour A., Younos C., Soulimani R., 2008.** Chemical Composition and Antioxidant Potential of *Ruta montana* L. Essential Oil from Algeria. *Journal of Medicinal Food*, vol.11, n.3, p.p.593-595.
- 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 K. G., Koumaglo H. K., Glitho I. A., Huignard J., 2006. Comparative effects of Cymbopogon schoenanthus essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* F. developpement. Fitoterapia, vol.77, p.506–510.

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.

Kim J.M., Marshall M.R., Cornell J.A. Preston J.F., Wei C.I., 1995. Antimicrobial activity of carvacrol, citral and geraniol against Salmonilla typhimurium in culture medium andon fish cubes.J. Food Sci., vol.60, p.p.1364-1374.

Kimball D.A., 1999. Citrus processing: A complete guide, 2nd 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.

Kocchilin-Ramonatxo, 2006. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition clinique et métabolique. vol. 20, p.p.165-177.

Kohen R., Nyska A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. Toxicologic Pathology. vol.30, p.p.620-650.

Kortenska V.D., Yanishlieva N.V., Kasaikina O.T., Totzeva I.R., Boneva M.I., Russina I.F., 2002. Phenols oxidant efficiency in various lipid substrates Containing hydroxyl compounds. European Journal of Lipid Sciences and Technology, vol.104, p.p.513-519.

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.

Lambert R.J.W., Skandamis P.N., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, vol. 91, n.3, p.p.453-462.

Larousse Encyclopédie des Plantes Médicinales, 2001. Identification, préparations, soins, Paris, 335p.

- 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.
- Leclerc H., Gaillard J. L., Simonet M., 1995.** Microbiologie générale: La bactérie et le monde bactérien. Ed. Doin, Paris. 535 p.
- 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.
- Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. La Presse médicale. vol. 30, p.p. 1076-1081.
- 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.
- Longaray Delmare A.P., Ivete T.M.P., Liane A., Luciana A.S., et Sergio E., 2007.** Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* and *Salvia triloba* cultivated in south Brazil. Food chemistry, vol.100, p.p.603-608.
- 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.
- Mahmoodi A., Roomiani L., Soltani M., Basti A.A., Kamali A., Taheri S., 2012.** Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils and Extracts from *Rosmarinus*

officinalis, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus*. Global Veterinaria. Vol. 9 (1), p.p. 73-79.

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.

Maksimovic M., DAnijela V., Mladen M., Marija E.S., Sabaheta A., et Sonja S.Y. 2007. Effet of the environmental condition on essential oil profile in two dinaric *Salvia* species: *Salvia brachydon vandas* and *Salvia officinalis* L. Biochemical Systematics and Ecology., vol.35, p.p.473-478.

Maria L. B., 2002. Lavender: The genus *Lavandula*. Medicinal and aromatic plants – industrial profiles. Taylor & Francis. vol.29, 268p.

Marino M., Bersani C. et Comi G., 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. Int. J. Food Microbiol., vol. 67, p.p.187-195.

Martínez-Cayuela, 1995. Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. vol.77, p.p. 147-161.

Martini M.C., Seiller M., 1999. Actifs et additifs en cosmétologie. Editions Tec & Doc, Paris, 102p.

Maydani M^a, 2000. Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. Am J Clin Nutr.,vol. 71, p.p.1665-1668.

Maydani M^b, 2000. Vitamin E and prevention of heart diseases in high-risk patients. Nutr Rev., vol.58, p.p.278-281.

Mayer G. B., 1989. Produits PFI- CO², une nouvelle génération de produits pour l'alimentation extraits au CO₂. 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.

Meena M.R., Setid V., 1994. Antimicrobial of essential oils from spices. J Food.SCI. And tech. Mysore, vol.31, p.p.68-70.

- Mejrib, J., A. Manef, M. Mejria, 2010.** Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L. Influence of drying, hydrodistillation duration and plant parts. *Industrial Crops and Products*. Vol. 32, p.p. 671-673.
- 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.
- Mioulane P., 2004.** Encyclopédie Universelle des 15000 plantes et fleurs de jardins ; Larousse ; Ed : PROTEA ; p.p.7-50.
- Mitsuda H., Yasumoto K., Iwami K., 1966.** Antioxidative action of indole compounds during the oxidative of linoleic acid. *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci.*, vol.19, p.p. 210-214.
- 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.
- Moleyar V., Narasimham P., 1992.** Antimicrobial activity of essential oils components. *Int. Food. Microbial*. vol.16, p.p. 337-342.
- Moll M., Moll N., 1998.** Les additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed. Dunod, 2^{ème} édition, Paris, Technique et Ingénierie, série Agro-alimentaire.
- 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.
- Morel Y., Barouki R., 1999.** Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*. vol.342, n.3, p.p. 481- 496.

- Moulin J.P., Pareau D., Rakib M. et Stambouli M., 2002.** Transfert de matière. Extraction liquide – liquide. Techniques de l'ingénieur, p.p.1-13.
- Nadkarni K. M., 1982.** Indian material medica (3rd ed.). Bombay: Popular Prakashan p.730.
- Nakahara K., Alzoreky N.S., Yoshihashi T., Nguyen H.T.T., Trakoontivakorn G., 2003.** Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). JARQ, vol. 37 (4), p.p. 249-252.
- Naves Y.R. 1974.** Qu'est ce qu'une huile essentielle. Ed. Masson, Paris.
- Nessrien M.N.Y., Mohamed A.T., 2007.** Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. World J. Dairy & Food Sci., vol. 2 (1), p.p. 01-09.
- Ngmao L.S.T., 2004.** Rapport technique (Septembre 2003-Février 2004), Projet interuniversitaire ciblé (PIC), 34p.
- Nogueira J. C. R., Melo Diniz M. F., Edeltrudes O.L., 2008.** In vitro antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. Bras Otorrinolaringol, vol.74, n.1, p.p.118-124.
- Novak, J., 2005.** Lecture held on the 35th International Symposium on Essential Oils, Giardini Naxos, Sicily.
- Novelli G.P., 1997.** Role of free radicals in septic shock. J Physiol Pharmacol. vol.48, p.p.517- 527.
- 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.
- Odoul M., 2003.** Les huiles essentielles. La lettre de l'Institut français de Shiatsu, n.2, p.p.1-12.
- 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.

Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z. et Naghdibadi H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control, Article in press.

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.

Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M., 2006. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control, Article in press.

Outaleb T., 2009. Huiles essentielles et extraits de romarin : composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne. Thèse de Magister. ENSA El-Harrach Alger. 112p.

Ownagh A., Hasani A., Mardani K., Ebrahimzadeh S., 2010. Antifungal effects of thyme, agastache and satreja essential oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. Veterinary Research Forum. 2; p.p. 99-105.

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.

Ozenda P., 2000. Les Végétaux : Organisation et diversité biologique, Ed. Dunod, 425p.

Ozkan G., Sagdic O., Baydar N.G. et Baydar H., 2003. Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. Food Science and Technology

International, vol.9, n.2, p.p.85-88.

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.

Paris R., Godon M., 1979. Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.

Parry J.W., 1969. Spices, NY: Chemical Publishing Co., vol.1 and 2.

Pascal G., 1979. Les antioxygènes alimentaires. *Cahier de Nutrition et de Diététique*, n°14, p.p.271-290.

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.

PDR for herbal medicines, Ed. Thomson, Montvale, 2004, third edition, 258p.

Pellerin P., 2001. Extraction par CO₂ à l'état super critique *Annales des falsifications et de l'Expertise de Chimique*, vol.94, p.p.51-62.

Perry J., Staley J., Lory S., 2004. Microbiologie. Collection : Sciences Sup, Dunod, 912p.

Pibiri M. C., 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilations au moyen d'huiles essentielles. Th. Doctorat, école polytechnique fédérale, Lausanne, 161 P.

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.

Pierozan M.K., Pauletti G.F., Rota L., Santos A. C. A.D., Lerin L. A., Di Luccio M., Mossi A.J., Atti-Serafini L., Cansian R. L., Vladimir Oliveira J., 2009. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*. Vol. 29(4), p.p. 764-770.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O., 2002. Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. vol.16, p.p. 233-239.

- Place L., Piccaglia R., 1995.** J. essent. Oil. Res., vol. 7, 443.
- Platzer N., 2002.** Application de la RMN à la détermination des structures. Techniques de l'ingénieur, Traité Analyse et caractérisation, 18p.
- Pokorny J., et al., 2003.** Lipides et corps gras alimentaires. Paris, Lavoisier, 380p. (Technique et Documentation)
- Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., 2000.** Antioxydants in food : practical applications. Woodhead Publishing, 388p.
- Pradeau D. et Cohen Y., 1992.** L'analyse protéique du médicament. Ed. médicales internationales, p.p. 418-428.
- 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.
- Prevett 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.
- Rădulescu V., Popescu M. L., Ilieș D. C., 2010.** Chemical composition of the volatile oil from different plant parts of *Anethum graveolens* L. (*umbelliferae*) cultivated in Romania. Farmacia., vol. 58(5), p.p. 594-600.
- Radulescu V., Silvia C., et Eliza O., 2004.** Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi volatile compound of *Salvia officinalis*. Journal of Chromatography A., vol.1027, p.p.121-126.
- 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.
- Rami K., Zheng-Guo L., 2011.** Antibacterial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. African Journal of Biotechnology. Vol. 10(42), p.p. 8397-8402.
- 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.

- Rashid ch. A., Qureshi M.Z., Raza S.A., William J., Arshad M., 2010.** Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*. Analele Universităţii din Bucureşti – Chimie (serie nouă), vol. 19, n°1, p.p. 23-30.
- Rasmy N. M., Hassan A. A., Foda M.I., El-Moghazy M.M., 2012.** Assessment of the Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts on the Shelf Life of Mayonnaise. World Journal of Dairy of Food Science. Vol. 7(1), p.p. 28-40.
- Rasooli I., Abyaneh M.R., 2004.** Inhibitory effect of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control, vol.15, p.p. 479-483.
- 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.
- Richard H., 1992.** Epices et aromates. Paris, Lavoisier, 339p. (Technique et Documentation).
- Ristic , Brikic D., Zalfija N.T., 1999.** *Salvia officinalis* L. Bric D (ed) Institute for medicinal plants Josif Panacic. Belgrade and Art Grafik Belgrade; p.p.151-167.
- Ristorcelli D., Tomi F. Casanova J., 1998.** ¹³C-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.
- Roeding-Penman A., Gordon M.H., 1998.** Antioxydant proprieties of Myricetin and Quercetine in oil and emulsions. Journal of amerivan oil chemist's society, vol.75, p.p.169-180.
- 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.

Ross S.A., El-Keltawi N.E., Megalla S.E., 1980. Antimicrobial activity of some Egyptian aromatic plants. *Fitoterapia*, vol.51, n.2, p.p.201-206.

Rouessac F. et Rouessac A., 1995. Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes. Ed. Masson, Paris.

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., Bessière 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.

Satyanarayana S., Sushruta K., Sarma G.S., Srinivas N., Subba Raju G.V., 2004. Antioxidant activity of the aqueous extracts of spicy food additives-evaluation and comparison with ascorbic acid in *in-vitro* systems *J. Herb. Pharmacother.*, vol. 4(2), p.p.1-10.

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.

Schoderet M. et collaborateurs, 1989. *Pharmacologie: Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*. Ed. Frison et Roche Paris, vol.2, p.p.509-918.

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.

- Siddhuraju P., 2007.** Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologic*, Vol.40, p.p. 982–990.
- 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 supérieur 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.
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B., 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* vol.269, p.p.8022-8028.
- Singh G., Maurya S., De Lampasona M.P., Catalan C., 2006.** Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: part 52, *Journal of Food Science*, vol. 70(4), p. 208-215.
- Singh N., Luthra P., Sangwan R.S., Thakur R.S., 1989.** Metabolisme of monoterpenoides 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.
- Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., 1997.** Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J. Agr. Food Chem.* vol.45, p.p. 3197-3201.
- Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., 2003.** Principe d'analyse instrumentale. Paris, De Boeck university, 956p.
- Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L., 1998.** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, vol.26, p.p.118–22.
- Soleimani M., Azar P.A., Tehrani1 M.S., Rustaiyan A., 2009.** Volatile Composition of *Ruta graveolens* L. of North of Iran. *World Applied Sciences Journal*, vol.7, n.1, p.p.124-126.

- Sorg O., 2004.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies.* vol. 327, p.p. 649-662.
- Southgate B. J., 1978.** Pests of grain legumes: Ecology and control. Press, New York p.225-227.
- Souza E.L., Stamford M.T.L., Lima E.O. et Trajano V.N., 2006.** Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, Article in press.
- 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.
- Sur, S.V., Tuljupa, F.M., Sur, L.I., 1991.** Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants. *J. Chromatogr.* Vol. 542, p.p.451-458.
- 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.
- Svoboda K.P. et Hampson J.B., 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plant: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, Scotland.
- Taiz L., Zeiger E., 2002.** Plant physiology. Sinauer Associates; Third Edition. 690p.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D.O., 2010.** Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*,. vol.21, p.p.1199-1218.
- Teuscher E., Anton R., Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec&Doc, Lavoisier, Paris, 105p.
- Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L. et Bryne D. H., 2006.** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol.19, p.p. 669–675.
- 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.

Tranchant J., Arpinaud P., Prevote A., Serpinet J., Vergnol A. et Witier P., 1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4^{ème} édition, Ed. Masson, 700p.

Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrob. Agents Chemother. vol.49, p.p. 2474-2478.

Tsankova E., Konkchiev A.N., Genova E M., 1994. J. Essent. Oil. Res., vol. 6, 375.

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.

Ultee A., Bennik M.H., Moezelaar R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. Vol.68, p.p. 1561-1568.

Upton 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.

Upton T. M., 1992. In search of Rosemary: A field trip to southern Spain.

Usmanghani K., Saeed A., Alam M. T., 1997. Indusynic medicine. Karachi: University of Karachi Press. p.273.

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.

Utida S., 1954. Phase dimorphism observed in the laboratory population of the cowpea weevil, *Callosobruchus quadrimaculatus*. Japanese J. Appl. Zool. 18, 161-168.

- Valero M. et Salmeron M.C., 2003.** Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 85, p.p.73-81.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. vol.160, p.p.1-40.
- 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.
- Vansant G., 2004.** Radicaux libres et antioxydant : principes de base. Symposium «Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.
- Vermin G., 1982.** Arome alimentaire et développement récents. Paris, Apria.
- Vinatoru M., 2001.** An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonic Sonochemistry* vol.8, p.303-313.
- Vokk R., Lõugas T., Mets K., Kravets M., 2011.** Dill (*Anethum graveolens* L.) and Parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) from Estonia: Seasonal Differences in Essential Oil Composition. *Agronomy Research*. Vol. 9, (Special Issue II), p.p. 515–520.
- Wagner G.J., Wang E., Shepherd R.W., 2004.** New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the plant trichome. *Annals of botany*, vol.39, n.1, p.p.3-1.
- Wang B.S., Chen Y. J., Liu S.H., Lin-Shiau S.Y., 2000.** An increase in free radical production by means of an anion channel blocker DIDS in mouse peritoneal neutrophils. *Proceedings of the National Science Council. Republic of China*. Vol. 24, n. 4, p.p. 178-186.
- Wang H.F., Yih K.H., Huang K.F., 2010.** Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 18, n°1, p.p. 24-33.
- 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.

Yangui, T., Bouaziz, M., Dhouib, A., Sayadi, S., 2009. Potential use of Tunisian *Pituranthos chloranthus* essential oils as natural disinfectant. *Lett. Appl. Microbiol.* Vol.48, p.p.112-117.

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.

Zegquad 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.

Zellagui A., Belkassam A., Belaidi A., Gherraf N., 2012. Environmental impact on the Chemical Composition and yield of essential oils of Algerian *Ruta Montana* (Clus.) L and their antioxidant and antibacterial activities. *Advances in Environmental Biology*. Vol. 6(10), p.p. 2684-2688.

Zheng G., Kenney P.M., Lam L.K.T., 1992. Anethofuran, Carvone and Limonene: Potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil and caraway oil, *Planta Medica*, vol.58, p.p.339-341.

Ziemons E., 2007. Etude en temps réel du processus d'extraction de la Tagitinine C en fonction des caractéristiques physico-chimiques du CO₂ supercritique à l'aide de fibres optiques couplant un spectrophotomètre IRTF à un extracteur à fluide supercritique. Thèse de doctorat, Université de Liège, 159p.

Zouari N., Fakhfakh N., Zouari S., Bougatef A., Neffati M., Ayadi MA., 2011. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food Bioprod. Process.*, vol.89(4), p.p. 257-265.

Résumé:

Les huiles essentielles de l'érigéron (*Conyza canadensis*) du fenouil commun (*Foeniculum vulgare* MILL.) de la lavande (*Lavandula stoechas* L.) et du genévrier (*Juniperus phoenicea* L.) ont été extraites à partir d'échantillons récoltés de diverses régions géographiques, sur différent stade de maturité et des saisons de cueillette successive, deux techniques d'extraction ont été employées (HD et ESSAM). Les extraits bruts ont été réalisés sur les feuilles des quatre espèces par Soxhlet.

L'analyse par CPG et CPG/SM des huiles essentielles a révélé des compositions chimiques très différentes selon diversité climatique, la procédure d'extraction et la date de récolte. Les extraits éthanoliques des plantes étudiées ont enregistré des rendements variables. Par ailleurs, ces extraits possèdent des teneurs élevées en polyphénols et flavonoïdes. L'évaluation de l'activité biologique 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. Les huiles essentielles testées contre les différents types de micro-organismes montrent la possibilité de leur introduction dans la formulation d'agents antimicrobiens à base de produits naturels.

Mots clés: Huile essentielle, extrait éthanolique, antioxydant, insecticide, activité antimicrobienne.

Abstract:

Essential oils of the érigéron (*Conyza canadensis*) of the commun fennel (*Foeniculum vulgare* MILL.) of the lavender (*Lavandula stoechas* L.) and of the juniper (*Juniperus phoenicea* L.) were extracted from samples collected from various geographical areas, on different stage of maturity and of successive gathering seasons, two techniques of extraction were employed (HD and ESSAM). The crude extracts were obtained from sheets of the four species by Soxhlet. The analysis of essential oils by GC and GC/MS revealed very different chemical compositions according to climatic diversity, the procedure of extraction and the date of harvest. The ethanolic extracts of the studied plants recorded variable yields. In addition, these extracts exhibited high percentages of polyphenols and flavonoïdes. The evaluation of the biological activity of essential oils and ethanolic extracts showed that the later displayed a strong antioxydant capacity compared to that of essential oils and the BHT. The high percentage of phenolic compounds would be at the origin of this important reducing capacity. The evaluation of the insecticidal activity of studied essential oils showed that they had a strong toxic effect against *Callosobruchus maculatus*, these last caused the death of the adults of this insect, a significant reduction of the fruitfulness of the females and fertility of laid eggs. The essential oils tested against the various types of micro-organisms shows the possibility of their introduction into the formulation of natural antimicrobial agents.

Keywords :

Essential oil, ethanolic extract, antioxydant, insecticidal, antimicrobial activity.

ملخص:

تم استخلاص الزيوت الأساسية للبايونج (*Conyza canadensis*) ، الشبث (*Foeniculum vulgare*) ، الحلحال (*Lavandula stoechas*) و العرعار (*Juniperus phoenicea*) من عينات أخذت من عدة مناطق جغرافية، على مختلف مراحل نمو النباتات و مواسم القطف. تقنيتان مختلفتان أستعملتا: التقطير المائي و التقطير بمساعدة الموجات القصيرة. المستخلصات الخامة استرجعت بواسطة تقنية Soxhlet

التحليل الكروماتوغرافي للزيوت الأساسية أظهر تركيبات كيميائية جد مختلفة حسب التنوع المناخي، تقنية الاستخلاص و موسم القطف. المستخلصات الخامة كشفت مراديد مختلفة، لكن من جهة أخرى أظهرت مستويات هامة من المركبات الفينولية و الفلنويدات. تقييم النشاط البيولوجي للزيوت الأساسية و المستخلصات المدروسة أظهر قدرة مضادة للتأكسد 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. اختبار الزيوت الأساسية ضد أنواع مختلفة من الأحياء الدقيقة كشف امكانية استعمالها كمضادات حيوية.

الكلمات المفتاحية:

زيوت أساسية، المستخلص الايثانولي، مضاد للأكسدة، مبيد للحشرات، نشاط مضاد للميكروبات.