

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للعلوم الفلاحية الحراش (الجزائر)

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE
EL-HARRACH (ALGER)

THESE

en vue de l'obtention du Doctorat
en Sciences Agronomiques

Par

Otmane BENCHABANE

**Extraits de l'épazote, de la fêrule et du thym : Etude de la
composition chimique et de l'activité biologique**

Jury :

Mme MOUHOUCHE F.	Professeur	Président
M. HAZZIT M.	Maître de conférences	Directeur de thèse
M. HACHEMI M.	Professeur	Examineur
M. BAALI-OUMEUR A.	Professeur	Examineur

Liste des abréviations

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
A.G	Acide gallique
Ar	Aryle
BHT	butyl hydroxy toluene
CMB	concentration minimale bactéricide
CMI	concentration minimale inhibitrice
FDA	Food and Drug Administration
g/kg	gramme par kilogramme
HE	huile essentielle
H.R.	Humidité relative
IC50	concentration inhibitrice de 50% des radicaux
IC90	concentration inhibitrice de 90% des radicaux
IUPAC	International Union Pure and applied Chemistry
OMS :	Organisation mondiale de la santé
ONG	Organisations non gouvernementales
ppm	partie par million
PV/jour	portion végétale par jour
Qr	Quercétine
UICN	Union internationale de la conservation de la nature
μg	microgramme
μL	microlitre



INTRODUCTION

Les plantes aromatiques et médicinales possèdent des vertus miraculeuses et personne ne peut en ignorer l'importance. Depuis l'antiquité et sur tous les continents, les plantes ont toujours tenu une place prépondérante dans l'art de guérir. Selon les cultures et les époques, elles ont été exploitées sous différentes formes de diverses manières et pour des usages les plus variés (**Moro-Buronzio A, 2008**).

À chaque région du monde, l'histoire des peuples montre la place importante qu'occupent les plantes aromatiques et médicinales dans la composition de leurs parfums et dans les préparations culinaires (**Bouzitouna ,2008**).

Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), 80% de la population mondiale a recours aux remèdes traditionnels qui reposent sur des espèces sauvages. 35 % des médicaments prescrits par les médecins en Europe sont d'origine naturelle, et plus de 40 % des médicaments en vente libre sont à base de plantes médicinales. De manière générale, la consommation de plantes médicinales a doublé en Europe, pendant la dernière décennie. (**Hostettmann, 2006**)

Par exemple, les plantes médicinales assurent les soins de santé primaires de plus de 3 milliards de personnes et alimentent une industrie représentant globalement plusieurs milliards de dollars par an. Plus de 100 pays disposent d'une réglementation en matière de plantes médicinales (L'OMS reconnaît la médecine traditionnelle et la définit comme l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les théories, croyances et expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques et mentales.

Les organismes vivants élaborent des molécules dotées de propriétés très diversifiées. Ainsi l'aspirine, l'anti-inflammatoire le plus utilisé au monde, a été extraite de l'écorce du saule, en 1829. De nouveaux antipaludéens ont été mis au point grâce à la caractérisation et à l'isolement de l'artémisinine, biomolécule extraite de l'*Artemisia annua* L., une plante utilisée en Chine depuis près de 2000 ans. Nous pourrions mentionner également le rôle du thym qui fournit le thymol, molécule utilisée comme agent antifongique et bactéricide; la menthe qui fournit le menthol, utilisé comme vasodilatateur....

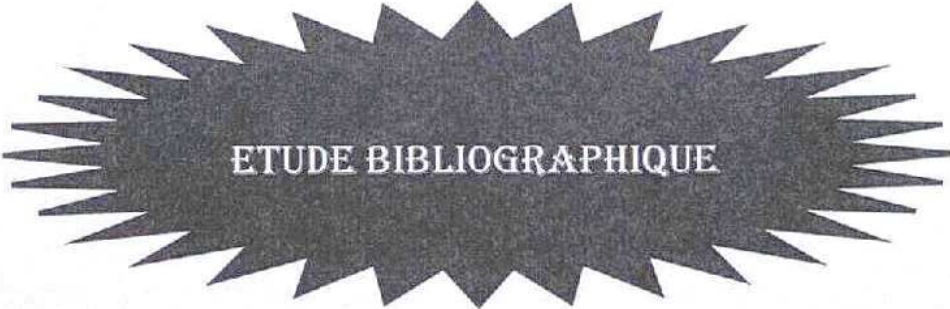
Mais alors que les milieux scientifiques et industriels prennent de plus en plus conscience de la valeur des plantes médicinales, l'existence de ces plantes est de plus en plus menacée. Selon la plus récente étude de l'UICN, 12.5% des espèces végétales (1 sur 8) sont menacées d'extinction.

La flore algérienne recèle un patrimoine végétal très riche, mais peu connu par manque d'études sur les vertus et les richesses qu'il peut probablement engendrer, celui-ci est malheureusement très peu exploité. Dans le but d'une contribution à la valorisation de la flore algérienne, notre choix s'est porté sur l'étude des huiles essentielles et des extraits éthanoliques riches en composés phénoliques d'une espèce de férule endémique du Sahara algérien, qui pousse à l'état spontané, il s'agit de la férule : *Ferula vesceritensis* Coss.et Dur , d'une espèce de thym endémique : *thymus munbyanus*.Boiss.etReut, et d'une espèce d'épazote originaire de l'Amérique du sud et qui s'est naturalisé dans le bassin méditerranéen : *Dysphania ambrosioides* L.

Les additifs alimentaires synthétiques utilisés en industrie agroalimentaire pour la conservation des denrées stockées sont aujourd'hui soupçonnés par le consommateur et par le scientifique d'avoir des effets néfastes sur la santé (toxiques, allergènes, cancérigènes...), cela a incité à des recherches pour les remplacer par des substances naturelles ayant les mêmes propriétés conservatrices comme les huiles essentielles et les extraits phénoliques des plantes.

Les études faites dans ce sens là ont déjà montré l'aptitude de ces substances naturelles à constituer une excellente alternative aux additifs chimiques synthétiques tels que les antioxydants (BHT, BHA, ...), les additifs antimicrobiens et les insecticides.

C'est dans ce cadre que vient s'inscrire notre travail qui porte sur l'étude de l'effet antioxydant des huiles essentielles et des extraits phénoliques des trois plantes en question : *Thymus munbyanus*.Boiss.etReut. *Dysphania ambrosioides*.L.et *Ferula vesceritensis*. Coss., mais aussi sur l'étude de leurs propriétés antimicrobiennes et insecticides (pour *Ferula* et *thymus* seulement).



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

LE THYM (*Thymus munbyanus* Boiss.et Reut.).

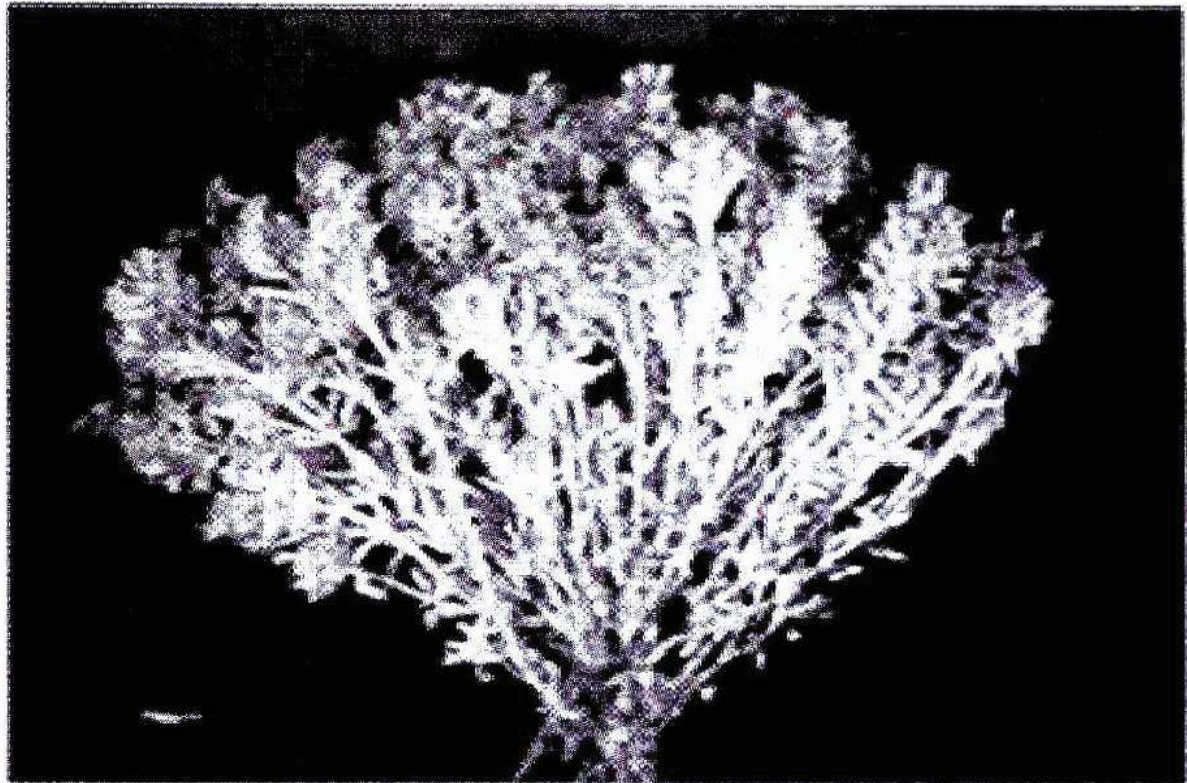


Photo de notre échantillon (*Thymus munbyanus* Boiss.et Reut.) photo juin 2011

Historique :

Le thym a toujours accompagné la vie quotidienne de l'homme à des fins médicales, cosmétiques et culinaires. Connu par Hippocrate et Dioscorides il était parmi les premières plantes médicinales dans la région méditerranéenne.

Le nom thym provient du mot Grec « *thymos* » qui veut dire odeur, et à ce titre le thym est très largement utilisé en qualité de plante aromatique, en particulier dans la cuisine méditerranéenne en tant que condiment (Richard *et al.*, 1985).

Le thym est connu depuis l'antiquité pour ses bienfaits sur la santé humaine. Galien avait dit à son propos « *Le thym est notoirement incisif et chaud. Il est propre à faire uriner et à provoquer le flux menstruel, à faire avorter et sortir l'enfant du ventre de sa mère et à nettoyer*

les parties nobles et intérieures : le prenant en breuvage, il est propre à faire cracher et jeter dehors toutes les superfluités de la poitrine et du poumon ».

Le célèbre médecin grec du V^{ème} siècle Aetius, écrivait dans son *Tetrabiblos*, que les patients utilisant du thym « évacueront la colère et les autres humeurs, et même la matière pourrie, piquante et mordante qui cause la douleur ». Il recommande le thym pour « les sciaticques, les douleurs des reins et de la vessie, la colite et les ballonnements, pour les mélancoliques et ceux qui ont l'esprit troublé ».

Pline conseille le thym en cas de « *toux invétérés* » pour l'expectoration et les maux d'estomac ou de l'intestin.

Les égyptiens utilisaient le thym pour embaumer leurs morts. Les grecs en brûlaient dans leurs temples, sur les places publiques ou devant les riches demeures. Chez les romains, le thym entraînait dans la composition de nombreux cosmétiques.

L'usage du thym se répand dans la pharmacopée au XI^{ème} siècle. Hildegarde et Albert le grand le mentionnent contre « *la lèpre, la paralysie et les maladies nerveuses* ».

Au moyen-âge, chevaliers et militaires mettaient du thym dans leur bain pour gagner en courage.

Il était enfin brûlé pour masquer les odeurs de nourriture avariée ou pour ralentir la putréfaction des chairs.

En 1887, Chamberland, démontra l'action bactéricide de l'essence de thym notamment vis-à-vis du bacille du charbon. Cadéac et Meunier l'étudièrent, en 1889, sur les bacilles typhiques et de la morve, la prolifération microbienne dans les bouillons de viandes. Morel et Rochaix, en 1921-1922, sur le méningocoque, le bacille d'Ebert, le bacille diphtérique, et le staphylocoque. Courmont, Morel et Bay, sur le bacille tuberculeux. En 1894, Miquel avait montré le pouvoir bactéricide des vapeurs de thym (Valnet, 1978).

Novi a démontré l'action activatrice sur les globules blancs des essences de thym, de lavande, de bergamote, de citron et de camomille : d'où l'action anti toxique et activatrice des défenses de l'organisme dans les maladies infectieuses, par stimulation d'une leucocytose curative (Valnet, 1978).

L'extrême variabilité et les hybridations interspécifiques, ont rendu la détermination des espèces très délicate (Quezel et Santa, 1962).

Environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen (Jalas, 1971). A cet effet la région méditerranéenne occidentale semble être le centre d'origine de ce genre.

1. Caractéristiques botaniques :

2.1 Classification :

Regne	<i>Plantae</i>
Sous-regne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>

Le thym appartient à la famille des Lamiaceae (Labiatae), c'est l'une des familles botaniques les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antioxydant et antibactérien (Bouhdid et al, 2006) ;(Hazzit et al, 2006). Elle regroupe entre 200 et 250 genres et entre 3200 et 6500 espèces (Anonyme ,2003) ;(Dorman et al,2004).

Thymus est l'un des huit genres les plus importants en ce qui concerne le nombre d'espèces chez la famille Labiateae, bien que le nombre d'espèces de ce genre change selon le point de vue taxonomique :si nous adaptons un caractère synthétique, il comportera alors plus de 200 espèces (Moralès,1997).

2.2. Description morphologique

Le thym est une plante sous-ligneuse érigée ou prostrée, odorante, il forme des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à une vingtaine de centimètres au-dessus du sol. Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocailleux et dans les garrigues.

Les feuilles du thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice quant à lui, est tubuleux à deux lèvres et la corolle est plus au moins exserte à deux lèvres aussi (Quezel & Santa, 1962).

-*Thymus* est un genre de plantes (couramment appelées **thym** ou **serpolet**) de la famille des Lamiacées. La forme de la fleur et la présence d'huiles essentielles signent cette famille (Kaufmann et al, 1994). Cette famille de plantes angiospermes dicotylédones à fleurs gamopétales irrégulières qui regroupe surtout des plantes herbacées et sous-arbustives réparties dans le monde entier. Les Lamiacées herbacées, annuelles ou vivaces, sont très nombreuses, exemple les Thyms,

les Lavandes, les Romarins sont surtout abondants dans les régions méditerranéennes (Moreau, 1960).

Les Lamiacées comptent plus de trois mille cinq cents espèces, quelque deux cents genres, répartis en onze sous-familles (Chemotypes). Ce sont des plantes rampantes ou en coussinet portant de petites fleurs roses pâles ou blanches. Ces plantes sont riches en huiles essentielles et font partie à ce titre des plantes aromatiques.

Le principal constituant de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est un terpénoïde qui lui doit son nom, le thymol, une substance bactéricide. Le thym est aussi fréquemment appelé *farigoule* (de son nom occitan : *farigola*).

1.1. Espèce étudiée : *Thymus munbyanus* Boiss.et Reut.

C'est une espèce présentant des feuilles florales vertes, en général fortement dilatées à leur portion inférieure, et sont différentes des feuilles caulinaires.

Les fleurs sont plus grandes à corolle plus longuement exserte

Les épis florifères quant à eux sont larges de 16 à 20 mm (figure 1)

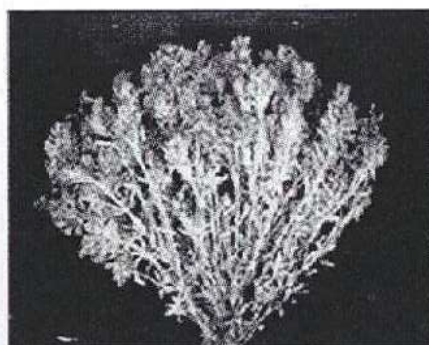


Figure 1 : *Thymus munbyanus* Boiss.et Reut.

2. Localisation et répartition géographique

2.1. Dans le monde

Le thym est distribué dans le vieux continent, sur les côtes du Groenland et dans la région macaronisienne (les canaries, Madère et les Açores).

C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye) ainsi que dans les montagnes d'Ethiopie, les montagnes d'Arabie du sud ouest et la péninsule de Sinaï. Passant par les régions arides de l'Asie occidentale jusqu'à l'Himalaya, il peut même atteindre les limites de la région tropicale et du Japon. Dans le nord, il pousse en Sibérie et en Europe nordique. (Jalas, 1971).

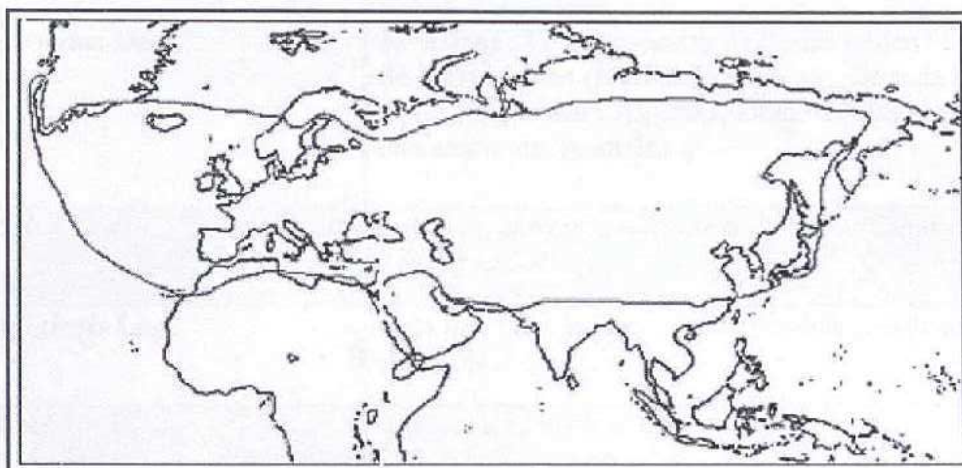


Figure 2 : Répartition géographique du thym dans le monde (Stahl-Biskup, 2002)

Ech.1/1000000

2.2. En Algérie

Le genre *Thymus* inclut environ 300 espèces à travers le monde dont 11 sont localisées en Algérie et 9 d'entre elles sont endémiques (Kabouche et al, 2005). Ces espèces sont réparties du Nord algérien à l'Atlas saharien (tableau 1)

Tableau 1 : Principales localisations géographiques du thym en Algérie (Quezel et Santa, 1962)

Espèce	Localisation et caractéristique
<i>Thymus pallescens</i> Boiss. et Reut.	Commun dans le tell Endémique Algérien.
<i>Thymus capitatus</i> L.	Très rare dans le sous secteur de l'atlas tellien
<i>Thymus dreatensis</i> Batt.	Très rare dans le sous secteur du tell constantinois et de la petite Kabylie.
<i>Thymus numidicus</i> Poiret	Assez rare dans : Le sous secteur de l'atlas tellien, le secteur du tell constantinois et petite et grande Kabylie.
<i>Thymus guyonii</i> De Noé	Rare dans : Le sous secteur des hauts plateaux Algérois, Oranais et constantinois.

<i>Thymus lanceolatus</i> Desf.	Rare dans : Le sous secteur de l'atlas tellien (Terni) et de l'atlas tellien (Médéa, Benchicao). Le sous secteur des hauts plateaux Algérois, Oranais (Tiaret) et constantinois (Aumale).
<i>Thymus pallidus</i> Coss	Très rare dans le sous secteur de l'atlas Saharien constantinois.
<i>Thymus glandulosis</i> Lag.	Très rare dans le sous-secteur des hauts plateaux Algérois et Oranais.
<i>Thymus hirtus</i> Willd.	Commun sauf sur le littoral.
<i>Thymus algeriensis</i> Boiss. et Reut.	Très commun dans toutes les régions montagneuses, rare ailleurs.
<i>Thymus munbyanus</i> Boiss.etReut.	Endémique dans le nord du secteur algérois.

4-Etymologie

Il existe plus d'une centaine de variétés de thym. La plus courante est le *Thymus vulgaris*, autrement appelée « serpolet » lorsqu'il s'agit de thym sauvage ou de « Farigoule » en province. L'origine du nom est sujette à diverses interprétations, le thym proviendrait aussi bien du latin *thymus* qui signifie "parfumer" que du grec *thumus* "courage", ou *thumos* "grosseur", ou encore, *thyein* "fumée".

Le nom thym proviendrait aussi du mot grec *Thymos* qui veut dire odeur, et à ce titre le thym est très largement utilisé en tant que plante aromatique, particulièrement dans la cuisine méditerranéenne entrant dans la composition du célèbre « bouquet garni » et en tant que condiment (Richard et al, 1985)

5-Composants

Le thymol et le carvacrol sont les composants principaux, ainsi que le paracymène, le 1,8-cinéol, le linalol et d'autres monoterpènes, triterpènes et flavonoïdes.

Les résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles de thym ont permis de distinguer 11 races chimiques ou chémotypes.

Les espèces ont été regroupées selon des chémotypes identifiés par la richesse en certains composants :

- chémotype 1 : huile riche en carvacrol,

- chémotype 2 : huile riche en mono terpènes aromatiques (principalement thymol) et plus pauvre en carvacrol,
- chémotype 3 : huile riche en 1,8-cinéol.
- chémotype 4 : huile riche en linalol.
- chémotype 5 : huile riche en citral.
- chémotype 6 : huile riche en α -terpinéol.
- chémotype 7 : huile riche en mono terpènes aromatiques et bornéol.
- chémotype 8 : huile riche en géraniol,
- chémotype 9 : huile riche en 1,8-cinéol, camphre et thymol.
- chémotype 10 : huile riche en *cis-/trans*-hydrates de sabinène et terpinen-4-ol.
- chémotype 11 : huile riche en cétones.

Il est à noter que la tige du thym contient en plus de l'huile essentielle, des flavonoïdes (thymonine, cirsilinéol et méthoxy-cirsilinéol) et des acides α -phénols (notamment caféiques et rosmariniques), des tanins et une résine (Haraguchi et al, 1996).

En pharmacie le thymol et le carvacrol sont employés en collutoires, dans les dentifrices, les savons, les onguents, les lotions, les pastilles pour la gorge et les remèdes anti gripes. L'huile essentielle de thym est une huile variable dans sa composition chimique. Cette dernière dépend d'un nombre de facteurs principalement d'origine génétique et édaphoclimatique, elle dépend aussi de la période de cueillette (stade végétatif).

6 Culture

Le thym est très résistant. Il pousse à l'état sauvage sur les collines arides et rocailleuses des régions méditerranéennes et dans les pays chauds d'une manière générale. Il a besoin de soleil et sa germination prend deux ans, il est préférable de reproduire la plante par division de racines, par marcottage ou par bouturage. Les plantations s'effectuent avec un intervalle de 30 cm. À chaque printemps, il est préférable d'engraisser la terre avec de l'engrais et de couper la plante de moitié pour favoriser l'apparition de nouvelles pousses. On récolte le thym à la fin de l'été.

7- Propriétés du thym

7-1: Usage interne :

- Stimulant général, physique et psychique.
- Tonique nerveux

- Hyper tenseur
- Antispasmodique, stomachique ;
- Balsamique, expectorant (modificateur des sécrétions).
- Antiseptique intestinal, pulmonaire et génito-urinaire.
- Stimulant de la leucocytose dans les maladies infectieuses, diurétique, sudorifique, emménagogue, carminatif, vermifuge et hypnotique léger (Valnet ,1978).

7-2 Usage externe

- Antiseptique et bactéricide.
- Antivenimeux.
- Dermatose, furoncles
- Plaies, irrigations vaginales, goutte.
- Chute de cheveux, aérosol (en association avec d'autres essences).
- Antiputride, cicatrisant, révulsif, antirhumatismal, parasiticide (Valnet ,1978).
- Comme herbe médicinale avec une action antispasmodique, fluidifiante, réduisant la flatulence.
- Contre les symptômes de la bronchite, inflammation des voies respiratoires, troubles gastro-intestinaux, stomatite, laryngite et les blessures cutanées superficielles.
- Confection des savons, parfums et détergents.
- Employé à l'extérieur en topique sur les hémorroïdes (Lieutaghi, 1966), les fissures anales, Il favorise en outre la circulation et est indiqué dans la suppression accidentelle des menstrues. Dans les règles douloureuses (Lieutaghi, 1966), insuffisantes ou supprimées par une cause accidentelle passagère (froid, émotion, etc..) ou même plus profonde (chlorose, affaiblissement etc..), l'usage de l'infusion concentrée de thym est d'une efficacité reconnue et le flux menstruel peut se produire parfois une demi-heure seulement après l'absorption. Il favorise également le sommeil (Valnet ,1978).

- se montre fort efficace et particulièrement sur les hémorroïdes en agissant non seulement par astringence mais aussi « d'une manière spéciale et directe sur les vaisseaux et les nerfs du rectum et cette action est tout à la fois astringente, tonique et sédative
- En herbes séchées, est employée pour donner de la saveur à la viande, aux conserves et aux sauces.
- Asthénie physique et psychique, neurasthénie, anémie (infantile), chlorose, asthme, toux convulsive (coqueluche...). affection pulmonaire (modification des sécrétions, antiseptique et antispasmodique). Digestions lentes. Infections intestinales et urinaires.
- Le thym est l'un des meilleurs remèdes contre les affections dues au refroidissement (grippe, rhum de cerveau, courbatures, frissons, angines...), les maladies infectieuses et les parasites intestinaux (ascaris, oxyures, ankylostomes, ténias).
- Il est à signaler que dans certains pays d'Afrique du nord on effectue même des désinfections hospitalières à base d'huile essentielle de thym par mesure d'économie.
- Le thym produit un miel distinctif qui commence à trouver des marchés de place en Europe et en Asie.

8- Quelques résultats d'application de l'huile essentielle de thym

8-1- Activité anti bactérienne

Une étude sur les effets anti-bactériens d'un certain nombre d'huiles essentielles sur les principaux microbes pathogènes du système respiratoire a été menée. L'activité de 14 huiles essentielles et de leurs principaux composants a été évaluée. Parmi les souches des quatre principales bactéries responsables d'infections respiratoires, *Haemophilus influenzae* était la plus sensible aux huiles essentielles, suivie par *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*; le *Staphylococcus aureus* y était le moins sensible.

Les huiles essentielles à prépondérance aldéhydique ou phénolique ont montré l'activité anti bactérienne la plus forte, suivies par celles contenant des alcools terpéniques.

Les huiles essentielles de thym ont été sélectionnées à côté des huiles d'écorces de cannelle, de limon grasse, de persilla et de menthe poivrée pour faire d'autres évaluations sur leurs effets anti-infectieux du système respiratoire (Zhiri, 2006).

8-2- Activité anti fongique

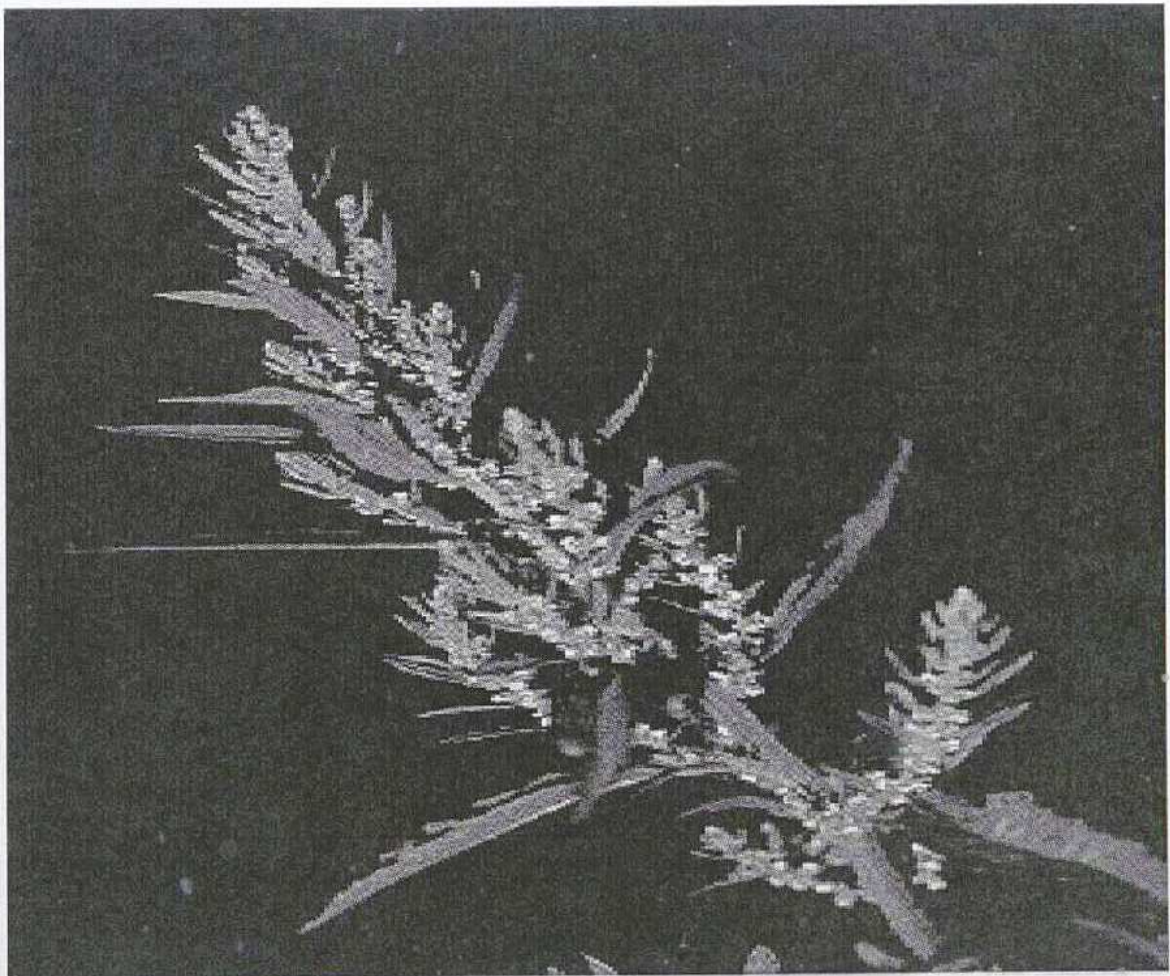
D'après **Roberto et al. , (1993)** l' huile essentielle de thym possède une activité antifongique vis-à-vis d'*Aspergillus* et de *Fusarium sp* contrairement aux huiles essentielles de la sauge et du Laurier.

8-3- Activité antioxydante

L'activité anti oxydante des plantes est une propriété liée principalement à la présence de composés phénoliques (**Ramarathnam et al, 1995**) ; dans certaines herbes culinaires séchées comme le thym, l'origan, la sauge et le clou de girofle la concentration en poly phénols dépasse les 75mmol/100g (**Draglant et al,2003**).Il est à signaler qu'un groupe de chercheur japonais a rapporté avoir observé une action antiplaquettaire dans deux composés isolés de l'huile essentielle de thym (**Okazaki et al ,2002**) .

CHAPITRE II

L'EPAZOTE (*Dysphania ambrosioides* L.)



1- Historique

Dysphania ambrosioides, (autrefois nommé *Chenopodium ambrosioides*), aussi appelé **fausse ambrosie, thé du Mexique, ansérine, ou épazote**, est une plante originaire d'Amérique Centrale et du Sud. Elle a été naturalisée à d'autres endroits, comme dans le bassin méditerranéen.

Dans le Yucatan en Mexique, les groupes indiens indigènes ont longtemps utilisé cette plante contre les parasites intestinaux, l'asthme, l'excès de mucus, la chorée (fièvre rhumatismale qui affecte le cerveau) et d'autres affections nerveuses. Les habitants de l'Amazonie utilisaient l'épazote comme un laxatif doux pour l'expulsion des vers intestinaux. Certaines tribus indiennes d'Amérique du sud l'ont également utilisé contre les vers intestinaux (sous forme de décoction de feuilles). D'autres confectionnaient des bracelets avec la plante et les portaient pour se parfumer. Cependant, la plupart des américains considèrent l'odeur de la plante assez forte et désagréable. Les créoles utilisaient le thé mexicain comme un remède contre le rhume pour les adultes tandis que les Wayāpi l'utilisaient comme décoction végétale pour les maux d'estomac et les hémorragies internes. Au Pérou, on l'utilise sous forme de décoction pour expulser les gaz intestinaux, on l'utilise aussi comme un laxatif doux, comme un insecticide, et comme un remède naturel pour les crampes, la goutte, les hémorroïdes, les vers intestinaux, les parasites et les troubles nerveux. Certaines tribus indigènes se baignaient dans des bains d'eaux imprégnés d'épazote pour réduire la fièvre, ils jetaient également la plante fraîchement déracinée sur leurs feux pour chasser les moustiques et les mouches.

C'est en 1895, que l'huile essentielle du thé mexicain fût extraite à partir des graines à des fins commerciales, elle a été ensuite officiellement inscrite dans la pharmacopée des états unis comme traitement de l'ascaris et des ankylostomes chez les humains, les chats, les chiens et les chevaux. Une étude de l'OMS de 1970 fait état de l'efficacité antiparasitaire d'une dose de 20g de décoction de feuilles. Un essai clinique effectué en 1996, a démontré l'efficacité antiparasitaire (anti Ascaris) de l'extrait de feuille d'épazote. Une efficacité antiparasitaire a également été démontrée contre le ténia de l'homme et les parasites intestinaux les plus fréquents (*Ancilostoma* et *Trichuris*) (Adebayo et al ,2010.)

2- Origine

L'épazote est une herbe indigène originaire d'Amérique Centrale mais elle est aujourd'hui naturalisée en Europe, en Afrique du nord et dans toute l'Amérique du Nord.(Taylor,,2005).

Elle possède un goût assez prononcé mélange de menthe, de citron et de myrte. Les fruits sont consommés vert et ce sont eux qui ont le plus de goût. Les graines sont également utilisées pour leur propriété vermifuge. (Taylor,2005).

3- Répartition écologique

L'épazote est une plante peu courante que l'on retrouve dans les lieux incultes, le long des routes, dans les cultures ou dans les terrains vagues. Elle préfère la lumière et se développe très bien à des altitudes allant de 270 à 900m, sur des sols légers, sableux et avec une bonne pluviométrie. Elle supporte les sols salins et préfère par ailleurs un sol modérément fertile et tolère un pH peu acide à légèrement basique allant de 5,2 à 8,3 (Huxley ,1992).Certain la considère comme une plante sauvage au vu de sa propagation facile et rapide.

4- Etymologie

Epazote : de son nom Nahuatl (dans la langue des aztèques) épatl : " mouffette " et de tzotl : "sueur, sale"

Ambrosioides, ambrosie : allusion à la nourriture mythologique des dieux grecs.Dans de nombreuses langues, cette plante est appelée « thé », se référant à son utilisation comme substitut du thé dans la préparation des infusions aromatiques.

4-1 Noms communs

Epazote ; Yerba-de-Santa Maria ; fausse giroflée ; Mastruco Apazote Chénopode ; Meksika Cayi ; Paico ; Pazote ; Semin Contra ; Contregas Simon ; Fausse Ambrosie ; Thé du Mexique ; Giroflée américaine ; Thé des jésuites ; Jerusalem Parsley ; Farinello aromatico ; Paiku ; Amush ; Camataï ; Cashua ; Amasamas ; Anserina ; Mastruco ; Americain Ambrosie ; Thé de Jerusalem ; Thé espagnol ; Ambrosie du Mexique ; Wurmsamen ; Hierba ; Hormiguera ; Anserina vermifuga.

4-2 Synonymes

Ambrina ambrisoides ; A. parvula ; Antillaise chénopode ; A. spathulata ; Atriplex ambrosioides ; Ambrosioides blitum ; Chenopodium anthelminticum ; C. integrifolium ;C.spathulatum ;C.suffruticosum ;Ambrosioides disphania ;(Chenopodium ambrosioides) (Jardim et al , 2008).

On l'emploie dans certains endroits comme assaisonnement pour la nourriture. Sa consommation serait à éviter pour les enfants en bas âge, les femmes enceintes. On l'emploie dans certains endroits comme assaisonnement pour la nourriture.

Bien que la famille admise aujourd'hui pour cette plante soit Chenopodiaceae, elle est parfois classée aussi parmi les Amaranthaceae ou les Dysphaniaceae (Mosyakin et Clemants, 2002).



Figure 3 :Dysphania ambrosioides(photo ENSA 2011)

5. Classification

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Caryophyllales
Famille	Chenopodiaceae(Amarantacées)
Sous-famille	Chenopodioideae
Genre	Ambrosioides

La famille Chenopodiaceae est composée de 120 espèces, dont 45 sont connues pour être distribuées partout dans le monde, et sont signalées pour leurs nombreuses propriétés médicinales (Koba et al , 2009).

6-Description morphologique

L'épazote est une plante dressée, ramifiée, herbacée annuelle ou pérenne, elle peut atteindre 1,20 m de hauteur. Irrégulièrement ramifiée, elle est parsemée de poils fins et courts ou presque glabres et présente un polymorphisme foliaire important, elle a plusieurs branches et possède des tiges rougeâtres multi-branchées, couvertes de petites feuilles fortement dentées, oblongues et lancéolées pouvant atteindre jusqu'à 12 cm de long.

Sa racine est un pivot ramifié. La tige est dressée, ramifiée depuis sa base, surtout lorsque la plante se trouve isolée. Les rameaux se distribuent de façon régulière et diminuent de taille vers l'extrémité de la plante, ce qui donne un port pyramidal.

La tige est cylindrique, pleine, finement pubescente, à poil vésiculeux blancs. Elle est parcourue de stries de couleur verdâtre et peut présenter une pigmentation pourpre.

À l'aisselle de ses feuilles larges, simples, alternes, courtement pétiolées, odorantes, dotées d'une face supérieure glabre et d'une face inférieure parsemée de petites glandes ovales de 4 cm de long et 1 cm de large ou elliptiques et fortement dentées se dressent des panicules de fleurs (Anonyme, 2010).

Son limbe est étroitement ovale ou elliptique, aigu au sommet, atténué en coin aigu à la base. Il a une longueur allant de 2,5 à 14 cm et une largeur de 1,5 à 3,5 cm. La marge est normalement sinuose dentée, mais peut aussi être irrégulièrement dentée. Les nervures sont proéminentes à la face inférieure. La face supérieure est glabre, d'un vert brillant alors que la face inférieure plus claire est parsemée de petites glandes sessiles jaunes, transparentes, remplies d'un liquide dont l'odeur est désagréable.

L'inflorescence de l'épazote est ample et très ramifiée. Les fleurs, petites, parfumées, jaunâtres et verdâtre de 0,5 à 1,5 cm de diamètre, sont regroupées par 4 ou 5 pour former de petits glomérules sessiles. Ces derniers se rassemblent en épis le long des rameaux terminaux. Chaque petit épi est sous-tendu par une petite bractée foliaire lancéolée. Les fleurs femelles présentent 3 à 5 pétales, tandis que les fleurs bisexuées en possèdent 4 à 5. Elles sont pubescentes à glabre, glanduleuses, lisses ou très rarement carénées. Les sépales peuvent être plus ou moins soudés. Les étamines sont par 4 ou 5, mais les avortements peuvent réduire ce nombre. L'ovaire est globuleux. Le fruit est un utricule indéhiscent et lenticulaire. Il présente un péricarpe glabre enveloppé par les pétales. Il ne contient qu'une graine, de forme lenticulaire, de 0,5 à 1,25 cm de diamètre et produite par millier ; elle est verte lorsqu'elle est fraîche et noire lorsqu'elle est sèche. Elle est luisante, avec un tégument presque lisse, marqué de lignes sinueuses.

7 Utilisation de la plante

L'épazote est surtout utilisé comme herbe culinaire pour sa saveur piquante âcre et légèrement citronnée, ainsi que pour son odeur rappelant le camphre, l'eucalyptus, voire la thérébentine (Jardim et al, 2008).

D'une façon générale, toutes les parties vertes de la plante sont utilisées, des feuilles aux fruits immatures. Connu pour son goût fort, le thé mexicain est caractéristique de la cuisine Maya dans le sud du Mexique et du Guatemala. L'herbe est utilisée fraîche dans les soupes, les salades, les plats de viande, les frijoles, les tortillas et les quesadillas. L'utilisation la plus commune est cependant dans les plats de fèves en raison de son pouvoir anti-flatulent. On l'emploie dans certaines régions comme assaisonnement pour la nourriture. Sa consommation serait à éviter pour les enfants en bas âge et les femmes enceintes.

En Afrique occidentale, l'épazote est cultivé principalement pour un usage médicinal pour le traitement des plaies et des œdèmes (Burkill, 1985).

Il est très efficace contre les parasites, y compris l'amibe responsable de la dysenterie, mais son efficacité est moindre contre le ténia (Bown, 1995 ; Weiner, 1980). La plante a été utilisée depuis très longtemps pour chasser les vers parasites du corps (Chevallier, 1996). En phytothérapie brésilienne par exemple, le thé mexicain est considéré comme étant un recours important pour les ankylostomes, les vers ronds et les vers solitaires, la plante est par ailleurs utilisée pour la toux, l'asthme, la bronchite et les maladies des voies respiratoires supérieures, pour soulager les gaz intestinaux, promouvoir la transpiration et aider la digestion. Dans la région amazonienne du Pérou on fait aussi tremper la plante dans l'eau pendant plusieurs jours et on l'utilise comme remède contre l'arthrite. En Amérique du sud, la plante est utilisée contre l'asthme, la bronchite, la diarrhée, la dysenterie et les troubles menstruels. En usage externe, elle a été utilisée comme lavage pour les hémorroïdes, les contusions, les plaies et les fractures ; et comme un cataplasme pour ses propriétés de cicatrisation et pour désintoxiquer les morsures de serpents et d'autres poisons et venins (Chevallier, 1996). L'épazote peut être aussi utilisé comme un insecticide botanique (Gadano et al., 2002 ; Travares, 2002).

La plante entière du thé mexicain est :

- Analgésique ;
- Antiasmique ;
- Antispasmodique ;
- Carminatif ;
- Antiplasmodiales (Pollack et al., 1990).
- Stomachique et vermifuge (Grieve., 1984 ; Lust., 1983 Singh et al., 1976).

8. Utilisation de l'huile essentielle de l'épazote

L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* L. Extraite par hydro distillation est incluse dans le formulaire national des états –unis et dans la pharmacopée britannique. C'est un liquide de couleur jaune pâle à jaune orangée devenant brunâtre par le vieillissement, ayant une odeur particulière désagréable et un goût amer.

8.1. utilisation

L'huile essentielle de l'épazote est un anthelminthique populaire (Kliks., 1985 ; Wynn., 1996), elle a été étudiée pour ses constituants chimiques (Pino et al ,2003 ; Cavalli et al, 2004). Elle est rarement utilisée pour aromatiser en raison de sa toxicité rapportée à faibles doses (Foster et Duke, 1990 ; Bown, 1995), mais elle est néanmoins utilisée dans de très petites proportions en parfumerie (Opdyke ,1976). Cette huile polyvalente est également connue pour ses propriétés anticancéreuses et anti tumorales in vitro (Foster et Duke ,1990). Des échantillons d'huile essentielle extraite à partir d'espèces recueillies en Afrique, à Madagascar (Cavalli et al ,2004), au Rwanda (Muhayimana et al ,1998) et en inde (Jirovetz et al, 2000) ont fait l'objet de nombreuses études. Elle est par ailleurs utilisée en extérne pour traiter les piqûres d'insectes et est largement utilisée dans la médecine populaire comme vermifuge et emménagogue (Comway et Slocumb ,1979).L'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* est connue pour inhiber la croissance des dermatophytes (Kishore et al.,1999) et d'autres champignons filamenteux tels qu'Aspergillus , Fusarium et Colleotrichum (Jardim et al ,2008).Elle possède également des propriétés antiaflatoxigenics , antipaludiques et anti oxydantes (Kumar et al,2007). Beaucoup d'autres activités biologiques de l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* L.ont été rapportées.

8.2. Composition chimique

L'huile essentielle de l'épazote est très riche en composés mono terpéniques. Les graines et les fruits renferment une grande quantité d'huile essentielle qui est principalement composée par un produit actif appelé Ascaridole.

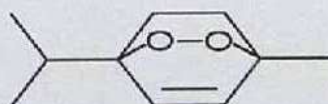


Figure 4 : Formule chimique de l'Ascaridole (1-méthyl- 4-(1-méthylethyl)- 2,3-dioxabicyclo[2.2.2]oct- 5-ene) selon la nomenclature IUPAC)

Ce composé chimique a été isolé en 1895 par un pharmacien allemand qui vivait au Brésil. Connu pour son caractère vermifuge, mais également connu pour ses propriétés sédatives et analgésiques ainsi que pour ses effets antifongiques

La plante de l'épazote est connue pour son odeur forte et distinctive, due à la présence de nombreux composés actifs tel que : l'alpha-pinène , l'aritasone , l'ascarodile, l'acide butyrique , le d-camphre , l'acide férulique , la géraniol , le l-pinocarvone ,le limonène , l'acide malique ,le menthadiène , les hyperoxydes menthadiènes , le salicylate de méthyles , le myrcène , le paracymène , le para-cymol , la safrole , les saponines , la spinasterol , l'acide tartrique , le terpinène ,l'acétate de terpinyle , le salicylate de terpinyle , le triacontyl-alcool , le triméthylamine et l'acide vanillique.

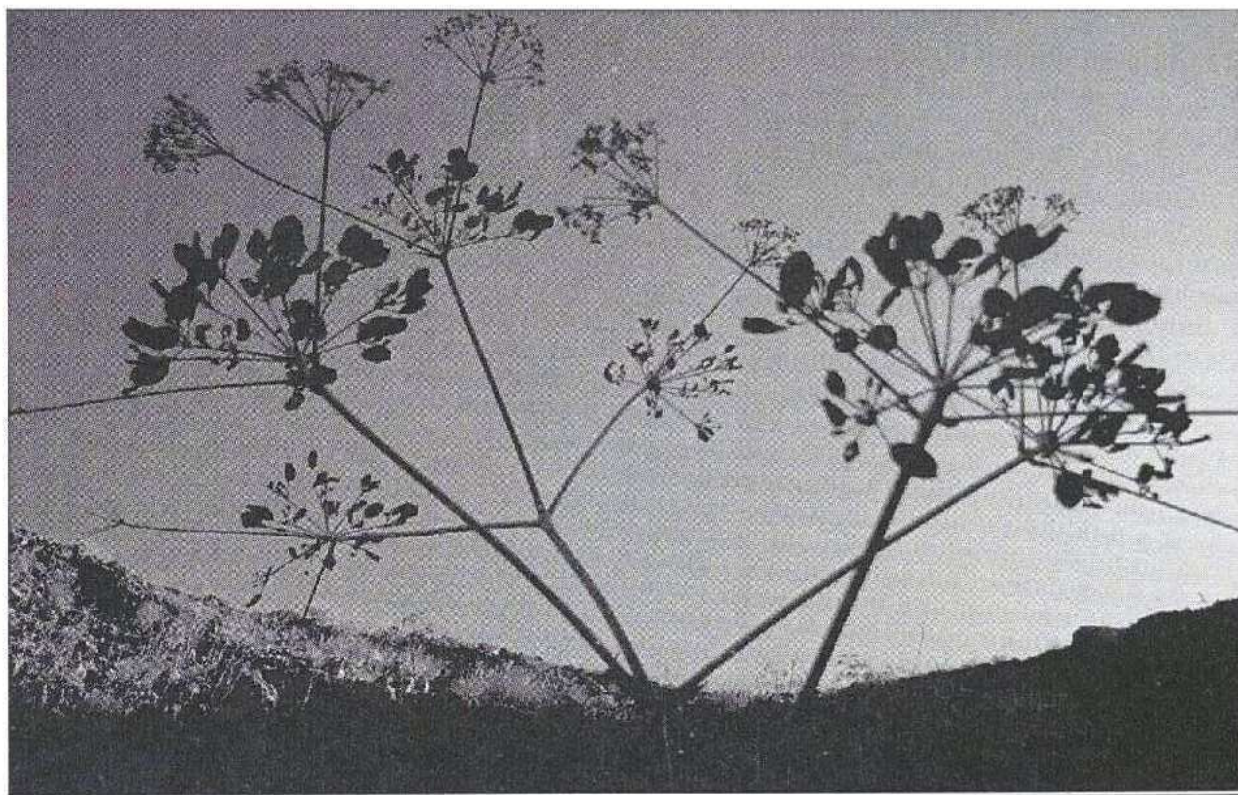
8.3. Toxicité

Une consommation excessive de l'huile essentielle du thé mexicain peut causer des étourdissements, des vomissements, des convulsions et peut même entraîner la mort (**Foster et Duke ,1990 ; Bown,1995**).

Cette forte toxicité de l'huile essentielle de l'épazote peut être essentiellement liée à la présence de l'ascaridole (**Malloy, 1923 ; Smilie et Pessoa ,1924**), qui provient généralement de la biotransformation enzymatique de l'alpha-terpène au sein de la plante (**Johnson ,1984**). D'autres chercheurs démontrent aussi que la forte toxicité de cette huile essentielle n'est pas due uniquement à la présence de l'ascaridole, mais aussi à d'autres constituants majoritaires, particulièrement le cymol et l'alpha-terpinène (**Azefack et al ,2003**).

CHAPITRE III

LA FERULE (*Ferula vesceritensis* Coss.et Dur.)



Ferula vesceritensis(Ghardaïa :Octobre 2012)

1-Historique

Le genre *Ferula* (du latin *férule*, "tige") regroupe environ 170 espèces de plantes herbacées de la famille des Apiacées, (Sahebkar et Iranshahi, 2010). Les espèces qui représentent ce genre en Algérie sont des plantes vivaces à tige élevée (1-3m) à feuilles 3-pennatiséquées, fleurs jaunes, fruits grands et lisses. (Quezel et Santa, 1963), originaires du bassin méditerranéen ainsi que de l'Asie occidentale et centrale. C'est une plante dont la croissance est spectaculaire au printemps, puisque en quelques semaines la tige peut atteindre

deux mètres voire même plus. Cette espèce est commune dans le bassin méditerranéen.

Les feuilles sont divisées en lanières allongées.

Les fleurs jaunes sont groupées en grosses ombelles sphériques

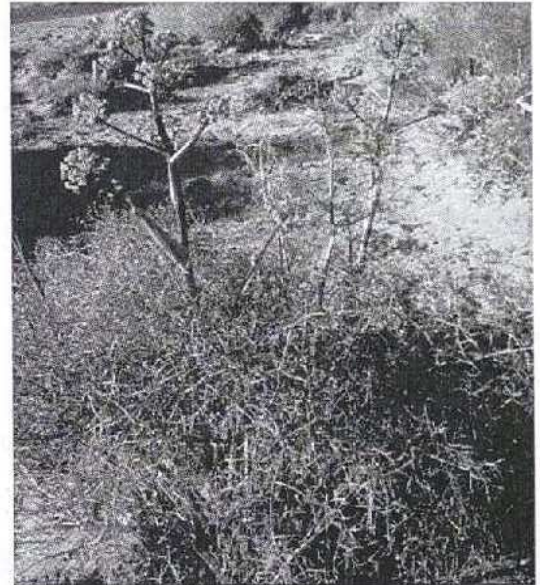


Figure :5 *Ferula vesceritensis*

(région de Ghardaïa :juin 2011)

Hauteur : 1 à 4 m

Ombelle : 10 à 15 cm.

Floraison : avril à juin.

Altitude : 0 à 400 m.

La férule était une baguette utilisée dans l'antiquité pour corriger les enfants (du verbe ferio, je frappe). Mais le nom de cette plante vient du verbe fero, je porte. Elle servait aussi à conserver et transporter le feu.

La plupart des ferules poussent dans les climats arides. Elles sont herbacées vivaces de croissance à 1-4 m de haut, avec vigoureux, creuses, les tiges un peu charnues. Les feuilles sont trépi gnâtes ou encore plus finement divisées, avec une gaine solide base embrassant la tige. Les fleurs sont jaunes, fabriqués en grandes ombelles . Beaucoup de plantes de ce genre, en particulier

F. communis sont considérés comme des "fenouil géant," même si elles ne sont pas des fenouils dans le sens strict du terme.

Les Romains appelaient la tige de lumière creuse fabriquée à partir de cette plante une *férule*. Ces tiges ont été utilisés comme cannes de marche , des attelles , pour remuer un liquide bouillant, et pour les châtiments corporels .

Dans l'antiquité, les entraîneurs des stades utilisaient la branche principale de la Férule séchée comme baguette pour « stimuler » les athlètes d'où l'expression encore utilisée : « être sous la férule de... »

La férule apparaît également dans la mythologie des contextes. L'arbre principal d'un thyse était traditionnellement fabriqué à partir de cette plante, et Prométhée a transporté clandestinement le feu à l'humanité en le cachant dans une férule .

2 Description morphologique

La férule et le fenouil sont de la même famille et ont un graphisme dentique, mais la ressemblance s'arrête là car si le fenouil est comestible, la **férule est entièrement toxique.**

La férule pousse en terrain sec, voire aride. Sa racine pivotante est très vigoureuse. Sa tige épaisse porte à la base des feuilles, vert émeraude, très découpées, à lobes linéaires et vers le haut des feuilles sessiles sur une gaine. Son inflorescence porte des fleurs jaunes

- Plante entière : grande plante herbacée à tiges épaisses et creuses, vivace, mesurant 1 à 4m.
- Feuilles : simples, de forme triangulaire et découpées en segments linéaires, les inférieures sont pétiolées et les supérieures engainantes
- Inflorescence : ombelles composées portant 20 à 40 rayons de fleurs jaunes, à pétales ovales à pointe recourbée en dedans ; floraison de juin à août
- Fruits : fruit ovale de 15 à 18 mm un peu ailé, chaque face étant marquée de 3 côtes peu saillantes.

3 Toxicité

Toute la plante est toxique, ce sont surtout les animaux qui font les frais. Les bergers vérifient toujours qu'il n'y a pas de férule dans les pâturages. Mais généralement la plante n'est pas broutée par les animaux. (Chehema ,2006). Selon des témoignages de la région du M'Zab, (transhumants et paysans) la férule *Ferula vesceritensis* Coss. qui est non brouté par les animaux d'élevage, cause à

ces derniers de graves troubles digestifs en cas d'ingestion, d'où il est intéressant de mener une étude sur la toxicité de son huile essentielle.

- Parties toxiques : parties aériennes et racines contenant un latex toxique, surtout en début de période végétative
- Principes actifs : plusieurs hétérosides à activité coumarinique (**férulenol, ferprénine...**)
- Circonstances d'intoxication : lors de mélange avec le fourrage ou lors de disette (consommation de plante verte qui est plus toxique)
- Toxicité : décrite chez les bovins, ovins et équins
- Doses : pour toutes les espèces, de l'ordre de 2.5g /kg PV/jour
- Organe cible : sang
- Symptômes : installation progressive avec diminution puis disparition de l'appétit, in rumination, prostration. On observe alors un syndrome hémorragique (épistaxis, pétéchies sur les muqueuses, hématurie, diarrhées hémorragiques et ictère) évoluant vers la mort
- Lésions : anémie, suffusions multiples, infiltrations hémorragiques et épanchements cavitaires, caillots.

4-Habitat et répartition géographique:

La férule pousse à l'état spontané dans les lits d'oued à fond rocailleux et dans les zones rocheuses. Elle se trouve en peuplements dans la partie orientale de l'atlas saharien et du Sahara septentrional, jusqu'au Mزاب, et à Karbous dans le sud tunisien. C'est une espèce de plante endémique saharienne. (Quezel et Santa, 1963 ; Chehema ,2006).

5-Utilisation :

Ferula vesceritensis est considérée comme une plante aromatique (Chehema, 2006) . Elle trouve ses utilisations en pharmacopée : ses fruits (graines) sont utilisés en infusion, pour le traitement des angines, des fièvres et des migraines.

6-Classification

Regne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Apiales</i>
Famille	<i>Apiaceae</i>

7-Appellation :

Le nom commun de *Ferula vesceritensis* Coss. est " la fêrule" (comme toutes les espèces du genre) et en arabe c'est "kalkha" (كلخ) ou "haltit" (حلتيت). (Chehema ,2006).

D'après notre enquête dans la région du M'zab , c'est à partir du nom commun en arabe de cette plante " kalkha" que dérive le verbe familier "kallakhlo" qui veut dire tromper quelqu'un en lui cachant la vérité de quelque chose qui est vide, dupé ou trafiqué. En effet, la plante présente en printemps une tige grosse et longue porteuse d'une belle inflorescence, alors qu'on se rend compte que cette même tige qui persiste durant tout l'été est creuse, c'est ce qui donne cet aspect à l'esprit.

8- Composition chimique

Les huiles essentielles de plusieurs espèces de fêrule ont été analysées chimiquement. La composition de 3 espèces de la flore italienne révèle l'existence des composés majoritaires suivants :l' α -pinène ,le β -pinène , le ϵ caryophyllène , le D-germacrène , l'oxyde de caryophyllène , l'aristolène et le (E,E)-farnésol.(Ferrari et al , 2005) ; (Maggi et al ,2009).

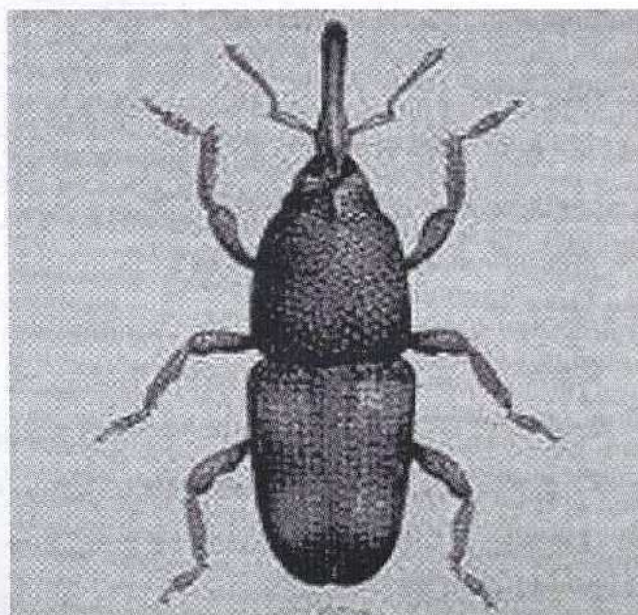
La composition de L'huile essentielle de *ferula assa- foetida* d'Iran est riche en E-1-propyl -sec-butyl disulfide (40%) et β - germacrène (7,8%) (Mostafa et al ,2005).

Quand à l'huile essentielle de notre espèce, l'analyse de sa composition chimique n'a pas été décrite auparavant. Nos propres travaux ont montré la prédominance des composés suivants : Viridiflorol (13,4%), δ -cadinène (10,1%) et farnésol (8,1%) (Benchabane O.et al, 2012)

Par contre la composition de l'extrait au dichlorométhane révèle l'existence des sesquiterpènes (10-hydroxylancerodiol-6-anisate ; le (2,10-diacétyl-8-hydroxyferutriol)-6-anisate ; le 10-hydroxylancérodiol-6-benzoate ; la visceritenone ;l'epoxy-visceritenol ;le faselol ; le farnesiferol A :le lapidol.2-acetyl-jaeschkeanadiol-6-anisate ;l'iasidiol-10-anisate et le 10-oxo-jaeschkeanadiol-10-anisate (Oughlissi-Dehak et al ,2008). Le

(10 α - acétoxy - 6 α angeloyloxy - 8 α - 9 α - epoxy - trans - caxotan - 4 β - ol) est un sesquiterpène caroténoïde possédant une activité anti cancéreuse, qui a été extrait de *ferula vesceritensis* (gamal et Hegazy, 2010).

CHAPITRE VI

Aperçu bioécologique sur l'insecte*Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763)

Le charançon du riz *Sitophilus oryzae* L. constitue l'un des plus graves insectes ravageurs des denrées stockées, qui bien adapté aux conditions climatiques sèches et tempérées, il se reproduit vite et facilement pour causer des pertes considérables des rendements à l'échelle mondiale ;pouvant atteindre parfois plus de 70 % en poids (Ndiaye, 1999). Ce coléoptère est capable d'infester les grains de céréales, les produits céréaliers durs mais aussi certains types de graines de légumineuses. (Mouhouche, 2009 ; Delobel et Tran1993)

La bonne conduite des conditions de conservation des grains stockés et l'utilisation de certaines techniques préventives peuvent réduire les dégâts, cependant c'est les insecticides qui représentent les moyens les plus employés dans la lutte contre ce ravageur. Actuellement, il y a recours vers l'utilisation de nouvelles substances naturelles comme biopesticides à cause de la résistance que manifeste le charançon du riz vis-à-vis des insecticides conventionnels, et à cause des impacts néfastes de ceux-ci sur l'environnement. (Benayad, 2007 ; Camara, 2009)

1. Systématiques :

Règne	<i>Animalia</i> ;
Embranchement :	<i>Arthropoda</i> ;
Sous-embranchement :	<i>Hexapoda</i> ;
Classe :	<i>Insecta</i> ;
Sous-classe :	<i>Pterygota</i> ;
Infra-classe :	<i>Neoptera</i> ;
Ordre :	<i>Coleoptera</i> ;
Sous-ordre	<i>Polyphaga</i> ;
Infra-ordre :	<i>Cucujiformia</i> ;
Super-famille :	<i>Curculionoidea</i> ;
Famille :	<i>Curculionidae</i> ;
Sous-famille :	<i>Dryophthorinae</i> ;
Genre :	<i>Sitophilus</i> ;
Espèce :	<i>Sitophilus oryzae</i> ;
Nom commun :	charançon du riz

(En anglais : Rice Weevil, en arabe : سوسة الأرز).

2. Caractères morphologiques**2.1. Ordre des Coléoptères**

Le terme coléoptère est composé de deux parties : "coléo" qui veut dire étui et "ptéra" qui veut dire aile, les coléoptères sont donc les insectes dont les ailes ont la forme d'étui.

Les ailes antérieures sont dures et tannées se rejoignant le long de la ligne centrale de la surface dorsale, alors que les ailes postérieures sont membraneuses, mais quelquefois absentes; les pièces buccales de type broyeur ; thorax est bien développé; les coléoptères sont caractérisés par une métamorphose complète, avec des stades à l'état d'œuf, de larve, de nymphe et d'adulte.

2.2. Famille des Curculionidés :

Les Curculionidés sont des insectes à corps cylindrique, pourvu d'un rostre prononcé (rigide) équipé de pièces buccales que la femelle utilise comme outil de perforation; antennes coudées en forme de massues fixées sur le rostre; tarses à 4 articles.

2.3. L'espèce *Sitophilus oryzae* L. :

Les adultes mesurent 2,5 à 4,5 mm de longueur (moyenne : 3,5 mm), de couleur brune à brune-noirâtre plus ou moins foncée (presque noir) et faiblement brillante, avec quatre grosses taches orangées bien définies sur les élytres qui sont ponctuées et striées. Le charançon du riz est également caractérisé par la présence d'un long rostre renflé triangulairement et portant des antennes de 8 articles à sa base, il possède des ailes postérieures membraneuses pouvant lui permettre de voler, cependant certaines souches paraissent avoir complètement perdu l'aptitude au vol. Le prothorax est recouvert de piqûres rondes ou irrégulières. (Delobel et Tran, 1993 ; Camara, 2009 ; Seck, 1991)

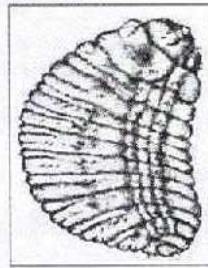


Figure 7 : larve de *sitophilus oryzae*
Au stade L₄ (2,5mm)

Le charançon du riz (*Sitophilus oryzae*) est très similaire morphologiquement au charançon du blé (*Sitophilus granarius*) et au charançon du maïs (*Sitophilus zeamais*). (Delobel et Tran, 1993)

✓ **La larve :**

La larve est longue de 2,5 à 3 mm, de couleur blanche, de forme subcirculaire, apode, charnue, et très peu velue. Les larves se développent à l'intérieur de la graine avec quatre stades larvaires. (Delobel et Tran, 1993 ; Camara, 2009 ; Seck, 1991)

✓ **L'oeuf :**

L'oeuf est ovale ou piriforme, sa couleur est d'un blanc opaque et brillant, il mesure 0.6 à 0.7 mm de longueur et 0.2 à 0.3 mm de largeur, il porte une protubérance à son extrémité qui lui permet de se fixer au substrat.

✓ **Dimorphisme sexuel :** Le rostre du mâle est plus court, plus épais et moins lisse que celui de la femelle: la face ventrale de l'abdomen est concave à l'apex chez le mâle, à peu près plane chez la femelle (Delobel et Tran, 1993).

3. Origine, répartition et habitats :

Le charançon du riz est essentiellement un habitant des stocks de céréales, il est originaire de l'Asie et plus précisément de l'Inde (Koehler, 2012), mais actuellement la majorité des auteurs le considère cosmopolite (il se trouve partout dans le monde comme tous les insectes transportés dans les grains), surtout présent en zones subtropicales et tempérées chaudes. Hors des greniers, cet insecte est observé dans la nature dans les fruits de *Quercus* sp. en Afrique du Sud. (Koehler, 2012 ; Delobel et Tran, 1993)

3. Conditions de développement :

Le charançon du riz ne peut se reproduire que dans un grain dont le taux d'humidité est compris entre 9,5 % et 16 %. Le développement de l'insecte est observé généralement sur une plage de températures allant de 13 à 35 °C, cependant la température optimale est de 26 à 31 °C, l'humidité relative de l'air optimale est de 70 ± 5 %. (Delobel et Tran, 1993)

4. Biologie et cycle de vie :

Le mâle du charançon du riz sécrète une phéromone d'agrégation dont la composante principale est le (4S.5R)-5-hydroxy-4-méthyl-3-heptanone ("sitophinone") actif envers les deux sexes, mais aussi envers *S. zeamais* et *S. granarius* (Delobel et Tran, 1993). La femelle pond environ 200 à 300 œufs, à une vitesse de 2 ou 3 par jour, en fonction de la température et de l'humidité. Les pontes débutent quelques jours après l'accouplement et se poursuivent pendant quatre mois.

Les femelles déposent leurs œufs dans un petit trou creusé grâce à leurs rostrés, dans le grain en scellant celui-ci avec un bouchon de salive mucilagineux qui durcit à l'air. À 18-20 °C, les œufs éclosent après 8 à 11 jours pour donner naissance à de petites larves blanches, dépourvues de pattes et qui se nourrissent de l'endosperme du grain. Une seule larve se développe parmi les petites graines comme celles du blé et du riz, mais des graines plus grosses comme celles du maïs supportent le développement de plusieurs spécimens. Les larves ne vivent jamais à l'air libre et se développent entièrement à l'intérieur du grain. Elles muent quatre fois, pour finalement se transformer en nymphes au sein des graines, après 6 à 8 semaines. Les adultes émergent après 5 à 16 jours supplémentaires et vivent environ 9 mois, cette longévité peut aller jusqu'à deux ans, d'après Delobel et Tran (1993). À une température de 15 °C et avec un taux d'humidité du grain égal à 11,3 %, le cycle de vie complet s'étend sur 6 mois. Cependant, dans de bonnes conditions (28 à 30 °C; 70 % HR), le cycle complet dure environ un mois.

Les adultes évitent généralement la lumière forte, mais sont très actifs quand ils sont secoués (Ndiaye, 1999). S'ils sont dérangés, les individus feignent la mort en repliant leurs pattes sur leur corps et en restant dans cette position. (Camara, 2009; Koehler, 2012)

5. Dégâts occasionnés :

Sitophilus oryzae est un bon voilier, capable d'attaquer les céréales stockées depuis les champs (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2001), et ainsi occasionner des pertes énormes pouvant dépasser les 30 % des rendements : pertes de poids de 75 % ou plus sur les grains de riz, pertes de l'ordre de 10 % sur les grains de maïs, et les dommages sur les autres grains se situent entre 10 et 75 % en fonction de la taille des grains. (Ndiaye, 1999)

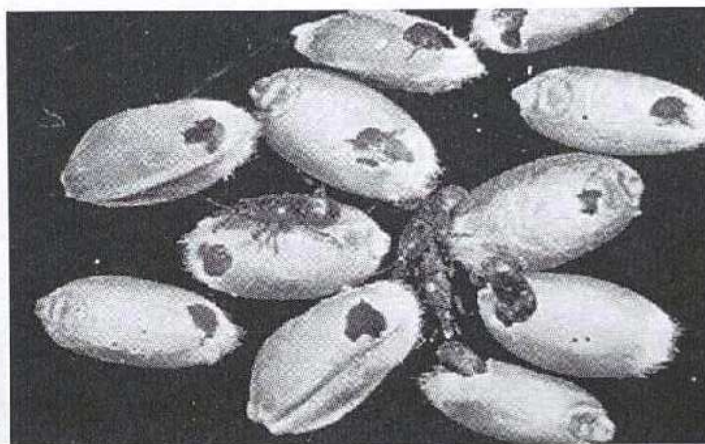


Figure 8 : dégâts causés sur le blé tendre infesté par le charançon du riz

Cet insecte est considéré comme un nuisible primaire des céréales puisqu'il est capable d'infester des graines non endommagées par ailleurs. Il s'attaque également aux produits céréaliers durs, comme les pâtes, macaronis et spaghettis.

Les aspects des dommages causés par ce parasite des grains de céréales sont :

- Les creux apparaissant dans les grains ou dans les produits céréaliers secs (les pâtes alimentaires) tout en abaissant leurs poids et détériorant la qualité originale ;
- L'apparition d'une teinte blanche provenant de leurs excréments poussiéreux qui contaminent le produit tout en le rendant désagréable au goût ;
- L'échauffement du grain qui accélère le développement d'autres insectes et rend la matière première sujette au durcissement, à la moisissure et même à la germination.

Une certaine idée du nombre gigantesque de charançons pouvant être générés est donnée par les résultats d'une étude dans laquelle, cinq semaines après l'infestation de blé par des formes larvaires, on a pu voir des adultes quittant le grain à la vitesse de 100 par kg et par jour. Mais malheureusement, ce n'est qu'après l'émergence des adultes que les dégâts deviennent visibles. Le charançon du riz est considéré parmi les principaux insectes ravageurs du riz, niébé, mil, blé et du maïs, toutefois il a une préférence pour les grains de petite taille comme le riz. (Ndiaye, 1999 ; Seck, 1991). Selon Mouhouche (2009) ; Delobel et Tran (1993) seules certaines souches géographiques de cet insecte sont capables génétiquement de se nourrir et de se reproduire sur les graines de légumineuses telles que le pois cassé, le pois chiche, et les lentilles.

6. Prévention et lutte contre *Sitophilus oryzae* :

6.1. Mesures préventives :

Elles peuvent être résumées comme suit :

- ✓ La préparation des cellules avant l'entreposage d'une nouvelle récolte en balayant le sol et les murs, en brûlant ou en enfouissant les balayures chargées de grains gâtés ou infestés, et en pulvérisant un insecticide de contact recommandé sur le sol et les parois ; (Koehler, 2012 ; Ndiaye, 1999 ; De Groot, 2004 ; Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2001)
- ✓ Conserver les grains secs et refroidir constamment les locaux de stockage, en y installant un système de ventilation ;
- ✓ L'inspection périodique des magasins de stockage en vérifiant la température et l'humidité et en examinant les grains tamisés, permet de déceler une éventuelle infestation et ainsi d'agir le plus vite possible ;
- ✓ L'utilisation des diverses techniques de piégeage : les pièges à trappe, les sacs d'appât, les pièges à détecteur d'insectes et les pièges adhésifs ;

6.2. Moyens de lutte :

De bonnes méthodes préventives de stockage combinées à une bonne hygiène, un séchage adéquat et à toutes les autres mesures de sécurité ne suffisent pas toujours à prévenir efficacement les pertes, d'où la nécessité d'utiliser d'autres moyens de lutte adéquats contre le charançon du riz en cas d'une éventuelle infestation.

6.2.1. Lutte chimique :

Il s'agit notamment de l'utilisation des différents insecticides qui agissent sur les insectes soit par fumigation, par un contact externe ou par une ingestion d'une matière traitée. La plupart d'entre eux affectent et perturbent le système nerveux.

On distingue les *insecticides organiques* (les organochlorés, organophosphorés, carbamates et pyréthriinoïdes représentent la grande majorité des insecticides organiques de synthèse qui ont été employés ou sont utilisés actuellement) et les *insecticides inorganiques* (généralement à base d'arsenic ou de fluosilice ou des cendres)

Exemples d'insecticides efficaces contre le charançon du riz : DDT (actuellement interdit pour haute toxicité), Pirimiphos méthyl (actelic), , Clorpyriphos méthyl (Reldan), Dichlorvos (DDVP)...

Les insecticides autorisés en stockage et conservation des denrées stockées combinent généralement une grande toxicité pour les insectes et une faible toxicité pour l'homme. Mais ils ont tous une certaine toxicité pour l'homme (Ndiaye, 1999), cela à incité les chercheurs à trouver des alternatives naturelles. Dans ce cadre, l'activité insecticide de différentes huiles essentielles et extraits végétaux contre *S. oryzae* a été étudiée.

6.2.2. Lutte physique et mécanique :

Elles concernent toutes les techniques mécano-thérapeutiques susceptibles de stopper ou de freiner l'infestation. Généralement, ces techniques sont recommandées pour pallier aux problèmes des résidus toxiques engendrés par les différents traitements chimiques. On peut citer :

- ✓ l'écrasement mécanique dans les « Entoletr » ;
- ✓ le traitement par le froid et la chaleur ;
- ✓ le stockage étanche ou sous atmosphère contrôlée ;
- ✓ les radiations ionisantes.

La lutte par le froid consiste à abaisser la température de stockage, ce qui entraîne un ralentissement du développement des insectes, celui-ci est freiné dès que la température est inférieure à 10 °C. Alors que la lutte par la chaleur consiste à une élévation de la température (température supérieure à 50 °C), ce qui entraîne la mort des insectes. Le passage des produits dans un séchoir permet également d'éliminer les insectes présents dans les grains.

Selon Koehler (2012), tous les stades évolutifs du charançon du riz peuvent être tués par une température extrême de 50 °C pour une heure ou par un refroidissement à -17 °C pour une semaine.

Le stockage étanche des grains dans des récipients hermétiquement fermés, l'injection de la neige carbonique, et l'utilisation de l'atmosphère modifiée, sont aussi des techniques efficaces contre *S. oryzae*. (Koehler, 2012)

6.2.3. Lutte biologique :

La méthode classique de lutte biologique est limitée à l'utilisation de micro-organisme, de prédateurs, et de parasites naturels du charançon du riz. Toutefois le concept de lutte biologique intègre dans sa définition actuelle toutes les formes non chimiques et comprend l'utilisation des substances naturelles d'origine végétale et l'utilisation des phéromones d'insectes attractifs et répulsifs.

Les produits à base de neem (arbre d'origine indienne de la famille des *Meliaceae*) tel que l'azadirachtine (qui est un extrait de neem) peuvent être employés contre *Sitophilus oryzae* entre autres espèces d'insectes ravageurs des produits stockés. L'action de l'azadirachtine est hormonale et antiappétante au stade larvaire et imago (VALLET, 2006 ; Mouffok et al, 2008). Certains producteurs luttent contre ces insectes en mélangeant les grains avec de la poudre insecticide, de la cendre ou des feuilles de neem. (Ndiaye, 1999).

Les huiles essentielles de trois espèces de menthes qui poussent spontanément au Maroc : *M. pulegium*, *M. suaveolens* et *M. piperita* . se sont avérées trop toxiques vis-à-vis de l'insecte *S. oryzae* avec un taux de mortalité très élevé. (Benayad, 2007)

7. Résistance de *S. oryzae* aux différents types de grains et aux insecticides :

Les cultivars de riz à glumelles hermétiques sont les moins infestés. Les cultivars de blé à grains durs hébergent des populations moins importantes que les cultivars plus tendres : mais ceci n'est nettement perceptible que si les écarts de dureté sont importants. Entre cultivar de duretés voisines, les différences de sensibilité qu'on peut observer tiennent davantage aux conditions culturales (Delobel et Tran, 1993). La sensibilité aux insecticides diffère selon les souches géographiques. (Delobel et Tran, 1993)

CHAPITRE V

LES HUILES ESSENTIELLES



LES HUILES ESSENTIELLES

La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un même récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes, la vapeur dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle (Robert, 2000). Hermann Boerhave (1668-1738) fut l'un des premiers à décrire les huiles essentielles d'un point de vue chimique (Lucchesi, 2005).

Vers le XX^{ème} siècle, les scientifiques commencent à s'intéresser à l'utilisation des huiles essentielles pour se soigner ou ce qu'on appelle aujourd'hui aromathérapie. Ce terme est utilisé pour la première fois par le chimiste français René-Maurice Gatte Fossé qui en 1935, publia son ouvrage « Aromathérapie » décrivant la relation entre la structure biochimique de l'H. E. et son activité.

En 1975, l'aromatologue Franchomme en France mit en évidence l'importance du chémotype dans la thérapie (Fouché, 2000).

Ensuite, les huiles essentielles ont largement bénéficié des progrès scientifiques et techniques tant sur le plan des procédés d'obtention que sur le plan des méthodes d'analyse de leur composition chimique.

Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes se sont développés, notamment par les civilisations arabes et égyptiennes, qui leurs attribuent avant tout un usage religieux (Sell, 2006). La première huile essentielle pure est produite grâce à Avicenne, médecin et philosophe (980-1037), une huile essentielle de roses, et pour cela il met au point un alambic. La distillation par la vapeur d'eau permettait l'extraction d'huiles essentielles pures de très nombreuses

plantes. Avicenne écrit de nombreux ouvrages médicaux dont il consacre une grande partie aux huiles essentielles. (Zhiri 2006 ; Bakkali et al, 2007).

Puis progressivement, ces huiles essentielles se font connaître pour leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants des médecines traditionnelles. En guise d'exemple, à l'époque des grandes épidémies dans la Grèce Antique, les principes odorants de certaines plantes aromatiques étaient répandus par fumigation dans les rues des villes pour combattre la propagation des maladies infectieuses.

La fumigation des personnes malades est en effet l'une des plus anciennes techniques thérapeutiques. Plus tard en France, il a été remarqué que les ouvriers parfumeurs et tanneurs, qui étaient en contact quotidiennement avec des huiles essentielles, résistaient de manière quasi-absolue aux épidémies de toutes sortes (Vanier, 1994).

De nos jours, l'usage des huiles est très large dans les domaines de la pharmacologie, la Cosmétique, l'agroalimentaire, et récemment l'agro phytosanitaire, et leurs propriétés thérapeutiques font l'objet de nombreuses recherches scientifiques.

1. Définition

Malgré l'usage courant de ce terme « huile essentielle », il est très difficile de lui attribuer une seule définition, car ses domaines d'applications sont tellement divers que l'on ne peut avoir une seule définition qui englobe et qui reflète toutes ses caractéristiques. Selon Conner (1993), « les huiles essentielles sont des produits odorants, volatils du Métabolisme secondaire d'une plante aromatique, normalement formées dans des cellules spécialisées ou groupe de cellules ».

D'après Teuscher et al, (2005), les huiles essentielles sont des mélanges de composés Lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Les huiles essentielles sont des composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur d'eau ou des solvants (Smallfield, 2001). D'abord le terme « huile » explique la propriété que possèdent ces substances de se solubiliser dans les graisses et leur hydrophobicité, alors que le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (Dumortier, 2006). Ces composés ont reçu empiriquement le nom « huile » vu leur caractère visqueux et hydrophobe (Bruneton, 1993).

L'association française de normalisation (AFNOR) définit l'huile essentielle comme:

« Un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydro distillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ». Cette définition est restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé (gaz sous pression, enfleurage). Selon la **Pharmacopée Européenne (1997)**, les huiles essentielles sont des produits de composition assez complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation.

2. localisation des huiles essentielles

Parmi les espèces végétales (environ 1 500 000 selon les botanistes), 10% seulement sont dites aromatiques, c'est-à-dire qu'elles synthétisent et secrètent d'infimes quantités d'huiles essentielles (**Bruneton, 1999**).

La synthèse des huiles essentielles revient aux appareils sécréteurs contenus dans les organes végétaux (feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, fruits et graines). Ces appareils sont souvent situés sur ou à proximité de la surface du végétal et c'est l'espèce à laquelle appartient l'arbre ou la plante qui va déterminer lequel va entrer en action : poils sécréteurs externes dans le cas des Labiées et des Géraniacées, cellules sécrétrices dans le cas des Lauracées, Magnoliacées et des Pipéracées, poches

sécrétrices dans le cas des Myrtacées, des Rosacées et Rutacées, et canaux sécréteurs pour les Ombellifères et les conifères (**Bruneton, 1999**).

3-Biosynthèse des huiles essentielles

La biosynthèse des huiles essentielles se fait suivant deux principales voies (Mann, 1987) :

3-1- Voie des Terpenoïdes

Le matériau de base est l'IPP (isopentylpyrophosphate), molécule à cinq atomes de carbones ayant une structure semi- alvéolaire. Il est dérivé de l'Acétyl CoA (carrefour important), lui-même issu du PEP (phosphoenolpyriviate) provenant directement du fructose. La construction des squelettes hydrocarbonés a lieu de la même manière par la juxtaposition "tête à queue" d'unités isopréniques, unités pentacarbonés ramifiées assemblées enzymatiquement. Ainsi on trouve des squelettes hydrocarbonés à dix carbones (monoterpènes), puis à quinze carbones (sesquiterpènes) et plus rarement, à vingt carbones (diterpènes). Le processus peut se poursuivre mais dans d'autres buts que la synthèse des essences.

3-2- Voie des Phénylpropanoïdes(voie chikimique)

La synthèse des huiles essentielles par la voie des phénylpropanoïdes commence par un métabolite du fructose, le PEP (phosphoenolpyruvate). Elle aboutit à un très grand nombre de substances aromatiques, via une série d'acides, dont l'acide shikimique (d'où son nom, voie shikimique) et l'acide cinnamique. Les métabolites terminaux, importants en thérapeutique, sont les acides aromatiques suivants: acides salicylique, cinnamique et benzoïque et leurs esters dont la salicylate de méthyle, les cinnamates, les benzoates, certains phénols (eugénol) ainsi que les coumarines,... Quelques grandes familles chimiques de molécules non volatiles, comme les tannoïdes et les flavonoïdes, se trouvent incluse dans cette voie (Spurgeon et Porter, 1981).

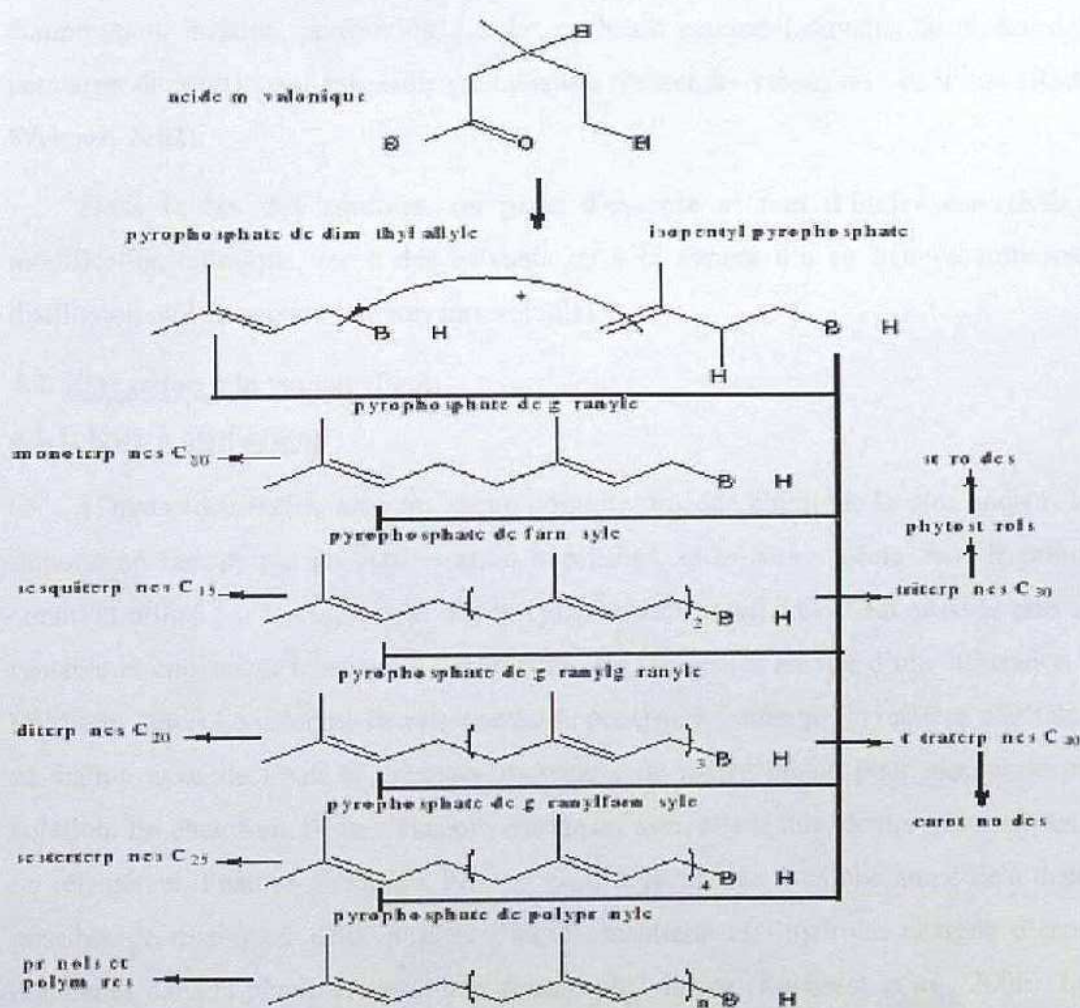


Schéma 1: Schéma général de la biosynthèse des terpénoïdes (Mann, 1987)

4- Procédés d'extraction des huiles essentielles

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction des huiles essentielles. C'est une opération des plus difficiles et des plus délicates, puisqu'elle a pour but de capter les produits les plus fragiles élaborés par le végétal et cela, sans en altérer la qualité (Lardy et Haberkorn, 2007).

4.1. Extraction à froid

Cette technique est utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes de la famille des Rutacées (citron, orange, mandarine, ainsi que la bergamote qui est issue d'un greffon de citronnier et de bigaradier). C'est une méthode assez simple qui consiste à briser mécaniquement (abrasion, compression, incision, perforation, ...) les poches à essence (souvent au niveau de l'écorce ou péricarpe du fruit) pour recueillir un mélange d'essences odorantes et d'eau (Richard, 1992 ; Werner, 2002).

Dans le cas des agrumes, on parle d'essence et non d'huiles essentielles car aucune modification chimique liée à des solvants ou à la vapeur n'a eu lieu (contrairement à l'hydro distillation ou l'extraction par solvants volatils).

4.2. Extraction à la vapeur d'eau

4.2.1. Hydro distillation

L'hydro distillation est sans aucun doute le procédé chimique le plus ancien. En effet, il fut importé en Europe par les Arabes entre le VIIIème et le Xème siècle mais le principe était déjà connu et utilisé par les Egyptiens dès le IVème siècle avant J.C. Il est aussi le plus utilisé, le plus rentable et convenant le mieux à l'extraction des molécules en vue d'une utilisation thérapeutique (Willem, 2002). Le principe de cette méthode consiste à immerger la matière végétale à traiter dans un ballon avec de l'eau et quelques morceaux de pierre ponce pour assurer le brassage de la solution. En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques, passant dans un réfrigérant, l'eau se condense. Elle est ensuite récupérée dans une ampoule à décanter où il est possible de distinguer deux phases: l'huile essentielle et l'hydrolat chargée d'espèces volatiles contenues dans la plante et ayant une densité plus élevée (Bachelot *et al* , 2006). La durée d'une hydro distillation peut considérablement varier, et peut atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter.

La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'huile (Lucchesi, 2005).

4.2.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats, le procédé de l'entraînement à la vapeur a été mis au point.

Cette méthode est similaire à la précédente sauf que la matière végétale ne macère pas directement dans l'eau. Elle consiste à introduire la masse végétale dans une colonne d'extraction à travers laquelle passe la vapeur. Cette dernière endommage la structure des cellules libère les particules d'huiles essentielles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant où elles seront condensées. Les phénomènes intervenant lors de l'entraînement à la vapeur seraient des phénomènes d'osmose et de diffusion libre.

Cette méthode est supposée apporter une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques car la matière végétale ne baigne pas dans l'eau bouillante (Franchomme et Péroël, 1990; Lucchesi, 2005).

4.2.3. Hydro distillation par micro-onde sous vide

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par micro-ondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (Bendahou *et al*, 2007; Lucchesi *et al*, 2007).

4.2.4. Extraction à l'eau surchauffée

Ce mode d'extraction utilise l'eau surchauffée sous pression entre 125 et 175°C. Il utilise l'eau désoxygénée qui traverse une cellule où se trouve la matière végétale. Cette cellule est maintenue à une pression d'environ 20 bars et à température constante dans une étuve. Ce procédé appliqué au romarin donne un rendement plus élevé en composés oxygénés que lors de l'entraînement à la vapeur (Basil *et al*, 1998).

4.2.5. Extraction-Distillation Simultanée

C'est une extraction liquide-liquide qui est menée dans un appareil dit de «Likens et Nickerson ». Les composés volatils entraînés par la vapeur d'eau sont extraits par des vapeurs de solvant que l'on condense ensuite dans un réfrigérant. Le solvant est recyclé en continu (Vermin, 1982).

4.3. Extraction par le dioxyde de carbone(CO₂) supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO₂ supercritique qui possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz , lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui en plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression.

La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO₂

Supercritique sous pression et réfrigéré. Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite. Le CO₂ s'évapore et il ne reste plus que l'huile essentielle (Bachelot *et al*, 2006).

Cette méthode est très prometteuse car le produit obtenu est proche du naturel et sans trace de solvant. De plus le CO₂ est non toxique, incolore, inodore et ininflammable, ce qui permet des conditions de sécurité supérieures.

4.4. Extraction par solvants

Certains organes de végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro distillation. C'est le cas des fleurs de jasmin, d'œillet, de tubéreuse, ...etc. Il faut donc, pour ces végétaux, recourir à d'autres méthodes d'extraction des composés odorants volatils. Ces méthodes sont l'extraction par les solvants fixes c'est-à-dire une extraction par les corps gras (enfleurage) et l'extraction par les solvants volatils (extraction par l'hexane...) (Garnero, 1996).

4.4.1. Extraction par solvant volatil

Elle est utilisée pour les plantes fragiles qui sont plongées dans une préparation chimique provoquant la dissolution des substances aromatiques. Après séparation du solvant par distillation, on obtient un produit cireux qui doit être dissout dans l'alcool. Ce dernier est ensuite éliminé par évaporation. L'huile essentielle ainsi obtenue est dite « absolue » (Lardy et Haberkorn, 2007).

L'extraction à l'aide de solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire (Bruneton, 1999).

4.4.2. Extraction par solvant fixe

Les solvants utilisés sont principalement des matières grasses. L'extraction peut être effectuée à froid (enfleurage) ou à chaud (macération).

4-4-2-1 Enfleurage

L'enfleurage est une méthode ancienne utilisée uniquement pour les fleurs fragiles. Elle consiste à pratiquer une diffusion des composés odorants dans une masse de matière grasse. Cette dernière absorbant ainsi les molécules odorantes. On remplace régulièrement les fleurs pour gorger au maximum les graisses (on estime qu'un kilo de graisse absorbe trois kilos de fleurs). La graisse est ensuite lavée à l'alcool dans des batteuses, l'alcool s'évapore et on obtient ainsi une absolue de pommade (concrète) (Telphon, 2003).

4-4-2-2 Macération

A l'inverse de l'enfleurage qui se fait à température ambiante, la macération utilise les mêmes graisses mais chaudes, ce qui a pour effet d'augmenter le pouvoir adsorbant. Le principe est basé sur l'immersion des fleurs dans une graisse préalablement portée à une température comprise entre 50 et 70°C . La durée du contact varie de 12 à 48 heures et la charge de fleurs est constamment renouvelée jusqu'à ce que la graisse soit saturée de parfum.

Puis le tout est filtré à travers plusieurs couches de tissu (lin et coton) afin de séparer la graisse inutile de la pommade. Cette pommade peut être utilisée telle quelle ou traitée par la même méthode que pour l'enfleurage à froid afin d'obtenir une absolue. (Telphon, 2003).

5. Méthode d'analyse des huiles essentielles

Lorsque l'huile essentielle d'une plante est extraite, il est utile d'abord d'en connaître sa composition chimique et ensuite quelques paramètres physico-chimiques qui seront nécessaires à la qualification de la dite huile.

La meilleure carte d'identité d'une huile essentielle reste cependant son profil

Chromatographique en phase gazeuse. Ce profil permet de connaître avec exactitude la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels les pesticides ou les produits chimiques ajoutés.

5.1 Analyse chromatographique

En alliant une technique de séparation de haute résolution à une méthode de détection très sensible, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) sont devenues des méthodes de choix pour l'analyse des mélanges aussi complexe que celle des huiles essentielles. Etant donné la gamme très diversifiée des concentrations des composés d'une huile essentielle, seules ces techniques de part leur grande sensibilité (de l'ordre du μg), permettent de contribuer à la résolution de la plupart des problèmes d'identification rencontrés.

5.1.1. Chromatographie en phase gazeuse (GC)

Actuellement, la méthode de dosage et d'identification, la plus couramment employée dans l'étude des huiles essentielles, fait appel à la chromatographie en phase gazeuse. Elle permet l'identification (au moins en principe) des constituants et l'obtention d'une valeur approximative des concentrations respectives. Cette méthode permet également de séparer de faibles quantités des différents composants de l'huile essentielle.

Le principe de cette méthode est basé 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). Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé (Tranchant *et al*, 1995).

5.1.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

Cette technique permet d'obtenir à la fois les temps de rétention des constituants volatils de l'échantillon pour un programme donné et leurs spectres de masse. Les systèmes modernes sont par ailleurs généralement pilotés par un logiciel, qui peut prendre en charge la comparaison automatique des spectres obtenus avec des bibliothèques de spectres contenant des informations sur des milliers de composés (Richard et Multon, 1992).

Le développement important de la spectrométrie de masse (SM) dans l'identification des constituants des huiles essentielles est rendu possible grâce au couplage du CPG directement à la spectrométrie de masse.

Lors du couplage, la chromatographie (CPG) permet dans un premier temps de séparer et d'isoler chacun des constituants du mélange qui est injecté séparément dans la chambre d'ionisation de la spectrométrie de masse (deuxième temps). Grâce à cette innovation importante, cette technique est devenue la plus sensible pour obtenir des données importantes sur la structure de composés organiques inconnus. Le principe consiste à soumettre un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes (**Richard et Multon, 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.

6. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont généralement des liquides incolores ou jaune pâle à température ordinaire. Elles sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1 (sauf les huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffras qui ont une densité supérieure à celle de l'eau). Elles ont un indice de réfraction qui varie essentiellement avec la teneur en mono terpènes et en dérivés oxygénés ; une forte teneur en mono terpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.

Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques (**Bruneton, 1995**).

7. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents (Sell, 2006). Elles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des composés terpéniques, prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane, retrouvé en tant que composé majoritaire dans quelques unes, telles que les essences d'anis, de cannelle, de girofle, etc.... Divers autres constituants minoritaires leurs sont associés.

De nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques (Sharma *et al*, 2003 ; Wagner *et al*, 2004).

7-1 : Les composés terpéniques :

Sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Et ils sont formés de la condensation de plusieurs unités isopréniques (C_5H_8), soit deux unités pour les mono terpènes ($C_{10}H_{16}$) (myrcène, β -pinène, γ -terpinène, etc....) et trois pour les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène, etc....) Exceptionnellement, quelques di terpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (Sharma *et al*, 2003) .Ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bi cycliques.

7-2 : Les composés aromatiques :

Sont moins abondants que les terpénoïdes, ce sont des arènes issues d'une voie métabolique secondaire dite de l'acide shikimique. Ce sont des composants odorants de type « phénylpropanoïdes » (Kurkin, 2003). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole ... (Ces composés sont caractéristiques des huiles essentielles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon.(Bruneton, 1999).

Il existe naturellement d'autres corps qui peuvent entrer en faible proportion dans la constitution de certaines huiles essentielles : acides organiques, cétones de faible poids moléculaire, coumarines volatiles ... (Bernard *et al*, 1988).

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette Hydrocarboné, constituant une chaîne plus au moins longue. Sur ce squelette de base sont souvent présents un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène (O): terpènes (ex : limonène, camphre), alcools (ex : linolool, géraniol), cétone (ex : thuyone, carvone), phénols (ex : thymol, carvacrol), aldéhyde (ex : aldéhyde cinnamique), éthers (ex : eucalyptol) (Pibiri, 2005).

CHAPITRE VI

ACTIVITES BIOLOGIQUES DES PLANTES AROMATIQUES

(HUILES ESSENTIELLES ET EXTRAITS ETHANOLIQUES)

Activités biologiques des plantes aromatiques

(Huiles essentielles et extraits éthanoliques).

1. Généralités

Les aliments lipidiques ne peuvent être stockés que pendant des périodes courtes à cause de la résistance insuffisante à l'oxydation par l'oxygène. Dans les aliments séchés, l'oxygène peut pénétrer très facilement dans la phase lipidique et la stabilité de ces aliments devient donc plus faible en présence d'eau. Ainsi, la stabilité des aliments séchés doit être testée, et si nécessaire, la fraction lipidique doit être préservée en rajoutant des antioxydants dans la formulation du produit alimentaire.

L'oxydation des lipides est une cause majeure de la détérioration de la qualité des aliments contenant des matières grasses, d'où l'utilisation devenue de plus en plus fréquente des antioxydants. Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont l'hydroxyanisole butyle (BHA) et l'hydroxytoluène butyle (BHT), l'hydroquinone de tertio butyle (TBHQ)... Ces composés sont assez volatils et/ou se décomposent rapidement à des températures élevées (**Branen, 1975**). Il existe de sérieux problèmes concernant l'utilisation et la toxicité de ces produits synthétiques, tant au niveau de leur métabolisme que de leur accumulation dans les tissus de l'organisme humain (**Linderschmidt et al, 1986**) ; ainsi les préparations et l'utilisation d'antioxydants naturels sont vivement Recherchées.

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries. Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens (**Bandoniène et al, 2000**).

Les huiles essentielles quant à elles, ainsi que les extraits aromatiques ont été utilisées pour leurs propriétés antiseptiques. Dans l'Egypte ancienne, les techniques de l'embaumement utilisant les résines aromatiques, ainsi que l'HE, produisaient une inhibition puis une destruction de tous les microorganismes présents, en assurant une conservation pratiquement infinie du corps. Dans les vieux ouvrages de médecine, les résines aromatiques ou l'HE étaient les principes actifs qu'on peut

retrouver dans les différentes drogues végétales ayant des propriétés antiseptiques significatives. Dans les ouvrages les plus récents, l'utilisation des huiles essentielles dans l'aromathérapie laisse entrevoir une perspective d'alternative aux médicaments de synthèse.

Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités suivantes :

- Fongistatique
- Insecticide
- Nématocide
- Herbicide
- Bactériostatique
- Anti oxydante

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens.

Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique.

Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, 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.

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Lamiacées : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, ...L'HE de thym d'Espagne (*Thymus capitatus*) est souvent rapportée comme étant parmi les huiles les plus actives. Dans notre étude, nous n'allons nous intéresser aux activités anti oxydantes, insecticides et antibactériennes.

2. Activités antioxydantes des plantes aromatiques :

L'oxydation des lipides est un processus qui fait intervenir plusieurs types de réactions, une variété d'intermédiaires chimiques et une multitude de facteurs. Cependant, plusieurs approches permettent de contrôler l'oxydation.

En termes de protection et de préservation des aliments, différentes mesures pour contrôler et minimiser l'oxydation de lipides sont recherchées par les industries agro alimentaires. Ceci implique le remplacement des acides gras polyinsaturés avec plus de lipides mono insaturés et stables ; une hydrogénation partielle des lipides polyinsaturés, le contrôle du paramètre de stockage comme la limite d'aération, la minimisation des traces de métaux, ainsi que des conditions de stockage appropriés (Decker, 1998; Frankel, 1998). Néanmoins il est quasi impossible de maîtriser pratiquement tous les facteurs qui provoquent l'oxydation. Cependant l'ajout des antioxydants peut prévenir ou ralentir le processus d'oxydation. Un antioxydant est un réducteur, mais un réducteur n'est pas nécessairement un antioxydant (Prior *et al*, 1999). Le terme « antioxydant » a été formulé comme « une substance qui en faibles concentrations, en présence du substrat oxydable, ralentit ou empêche significativement l'oxydation des substrats matériels » (Halliwell, 1995). « Food antioxydant » est spécialement formulé comme « une substance qui, en faible quantité, est responsable du ralentissement de l'oxydation des composés facilement oxydables comme les acides gras. » (Frankel *et al*, 2000). Cependant, derrière cette simple description se cache un phénomène très complexe qui est celui de l'oxydation-anti oxydation. Les antioxydants exercent leur protection à différents stades de l'oxydation lipidique et par l'intermédiaire de mécanismes différents. Une distinction doit être prévue entre une courte et une longue protection de l'antioxydant par rapport à la cinétique de réaction (Antolovich *et al*, 2002). La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement selon leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique.

2.1. Oxydation et auto oxydation

L'oxygène est le premier élément essentiel pour la vie, responsable du fonctionnement normal de tout le système aérobie (Namiki, 1990). Par contre la molécule de dioxygène (O_2) est responsable d'un nombre de processus d'oxydation suivi de mauvaises conséquences comme le stress oxydatif (Dalton, 1995; Garcia-Plazaola *et al*, 1999), la détérioration de la qualité des aliments (Finely *et al*, 1993; Hiramatsu *et al*, 1994; Frankel, 1996) ainsi que le désordre de la santé humaine qui est relié à l'oxydation des molécules biologiques (Bermond, 1990; Ramarathnam *et al*, 1995).

Les substances d'oxydation peuvent avoir différentes structures chimiques, ce sont les protéines, ADN, acides gras insaturés, cholestérol, phospholipides...Après l'eau et l'air, la nutrition est le troisième élément essentiel de la vie. Les lipides constituent les composés majeurs de notre nutrition, leur étude est donc un sujet très important pour la protection contre l'oxydation puisqu'ils sont des éléments constitutifs des membranes cellulaires.

En raison de leur insaturation, les lipides naturels sont très sensibles à l'oxydation. Le mécanisme d'oxydation le plus connu des lipides dans les aliments est l'auto-oxydation. Ce mécanisme radicalaire comprend trois phases,

- initiation
- propagation
- terminaison.

La plupart des aliments contiennent des traces de métaux résultant de l'emballage ou du stockage ou même de la composition alimentaire. Des traces de métal dans l'aliment avec des concentrations inférieures à 0,5 ppm sont suffisantes pour catalyser l'oxydation des lipides (Labuza, 1971; Larson, 1997). Le métal le plus actif est celui qui est capable de subir une réaction de transfert d'électrons:
$$RH + M \rightarrow R + MH$$

La conséquence du mécanisme d'initiation est la formation de radicaux lipidiques et ce stade du processus s'appelle Initiation de l'oxydation. La réaction est lente et la concentration du radical au début est faible.

Le mécanisme détaillé dans lequel le radical libre est formé à partir d'un lipide n'est pas encore totalement élucidé et fait l'objet d'études.

La phase de propagation commence à la fin de l'initiation. Le radical libre généré réagit très facilement avec le radical oxygène (O_2) pour produire le radical peroxyde ($ROO \cdot$), cette réaction est rapide et la concentration en radicaux peroxydes augmente très rapidement. Le radical peroxyde attaque d'autres molécules lipidiques afin de produire des lipides hydro peroxydes ($ROOH$) et la prolifération des radicaux libres dans le système. Le radical peroxyde ($ROO \cdot$) est considéré comme la molécule clé dans la réaction d'oxydation des lipides. Selon le degré de saturation du lipide, le radical peroxyde peut être dissocié en des hydroxyles radicalaire (HO) et alkoxy (RO); cette phase s'appelle liaison (Branching) le radical hydroxyle est extrêmement réactif (demi vie 10^{-9} s) (Pietta, 2000). Il attaque toute espèce dans son entourage, ce qui va produire des milliers de radicaux libres et accélérer le processus d'oxydation.

La décomposition des hydro peroxydes donne lieu à la formation de produits volatils à faible poids moléculaire, comme les aldéhydes, les cétones, les hydrocarbures et les acides. Ces produits d'oxydation secondaire sont très importants dans le domaine alimentaire, à cause de l'odeur qu'ils produisent (phénomène de rancissement). Une très faible quantité de l'ordre du ppm est capable de donner une odeur inacceptable pour l'aliment (Labuza, 1971). Les produits d'oxydation secondaires

participent à plusieurs réactions, comme l'oxydation, la décomposition, la polymérisation, etc. Les produits obtenus à partir de ces réactions affectent négativement la couleur, la texture et la qualité de l'aliment (**Bermond, 1990**). Ils peuvent réagir avec les protéines et produire une désactivation des enzymes (**Decker, 1998**).

La présence de ces radicaux instables dans notre organisme est en grande partie responsable du vieillissement prématuré de nos cellules et de la pathogenèse de nombreuses maladies telles que les taches sur la peau, le cancer et les maladies dégénératives (sclérose en plaques et maladie d'Alzheimer).

2.2. Présentation du processus d'auto oxydation

En chimie, l'oxydation se définit comme une perte d'électrons, d'un atome, d'un ion ou d'une molécule. Une oxydation est une réaction d'altération qui touche la majorité des aliments (Glucidiques, lipidiques, protéiniques et autres,...) sous l'action du dioxygène provenant le plus souvent de l'air. En effet elle touche principalement les lipides insaturés lors de la préparation et de la conservation des produits utilisés par l'homme dans des domaines divers (agro-alimentaire, pharmacologie et la cosmétologie) (**Cillard J, 2006**). La prévention de l'oxydation des aliments s'organise dans deux directions :

- Protéger les aliments de l'air, de la lumière et les conserver à basse température ;
- Utiliser les propriétés d'un antioxygène ou antioxydant.

2.2.1. : Substrats et mécanismes de l'oxydation :

Les divers processus de l'oxydation qui ont été démontrés scientifiquement mettent en œuvre des mécanismes réactionnels complexes très différents dont les dommages oxydatifs sont souvent irréversibles au niveau d'un grand nombre de substrats biologiques. Ces mécanismes diffèrent essentiellement du substrat de l'oxydation qui peut être :

- Des lipides
- Des glucides simples et complexes
- Des protéines
- Des acides nucléiques (**Eymard, 2003**)

2.2.2. : Oxydation des lipides :

Les phénomènes d'oxydation des lipides sont surtout redoutés lors de la conservation des aliments puisque les dégradations oxydantes des lipides conduisent à une perte en vitamines, une diminution de la valeur nutritionnelle (acides gras essentiels), une détérioration du goût (composés

volatils à flaveur caractéristique, rancissement) et même parfois à l'apparition de substances toxiques (aldéhydes, hydrocarbures, cétones,...) (Pokorny et al, 2000)

Les cibles de l'oxydation des lipides au niveau moléculaires sont les insaturations des acides gras, et par conséquent toutes les molécules qui les contiennent dans leurs structures telles que les glycérides et les phospholipides, sont à considérer. Les acides gras polyinsaturés y compris les $\omega 3$ qui sont essentiels et ont un apport bénéfique pour la santé sont également très sensibles à l'oxydation.

En outre, les isomères cis s'oxydent plus facilement que les trans ; les doubles liaisons conjuguées sont plus réactives (Croguennec T, 2006).

L'oxydation des lipides connue encore sous le nom peroxydation lipidique résulte de l'action directe de l'oxygène sur les acides gras. Cette réaction se déroule en trois phases suivantes (figure ???).

2.2.2.1. : Phase d'initiation

Elle consiste en la rupture homolytique, occasionnée par un initiateur radicalaire, d'une liaison C-H de la chaîne d'un acide gras, ce qui en fait un composé radicalaire très réactif vis-à-vis de l'oxygène et qui va donc se transformer en radical peroxyde. Ce mode d'initiation, favorisé par une élévation de température, peut être produit par des radiations ionisantes, des générateurs chimiques, des systèmes enzymatiques ou chimiques produisant des espèces activées de l'oxygène, ou de traces.

2.2.2.2. Phase de propagation

Phase de propagation au cours de laquelle le radical peroxyde va arracher un hydrogène à un autre acide gras, créant un nouveau radical et entretenant ainsi une réaction en chaîne, pour se transformer en hydroperoxyde.

Lors de cette phase un seul radical libre peut initier la formation de 1000 molécules d'hydroperoxydes 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 T, 2006).

Cette étape se traduit aussi par l'évolution des hydroperoxydes en composés secondaires d'oxydation, par deux voies principales :

- - Une voie dite de scission, conduisant par coupure à la libération de composés volatils, notamment aldéhydiques, responsables de flaveurs de rance, caractérisés par un seuil de détection très faible ;
- - Une voie dite de remaniement, conduisant ensuite à différents types de pontage intra ou inter-acides gras et à l'apparition d'acides gras oxydés, de triglycérides oxydés ;

Au cours de la phase de propagation l'auto-oxydation s'entretient d'elle-même, les lipides insaturés disparaissent progressivement. Puis, la concentration en hydroperoxydes croit pour atteindre son maximum (Richard, 1992).

2.2.2.3. Phase de terminaison

La réaction s'achève d'elle-même lorsqu'il n'y a plus de molécules disponibles ou par recombinaison de deux radicaux libres entre eux pour conduire à un produit qui n'est pas un radical.

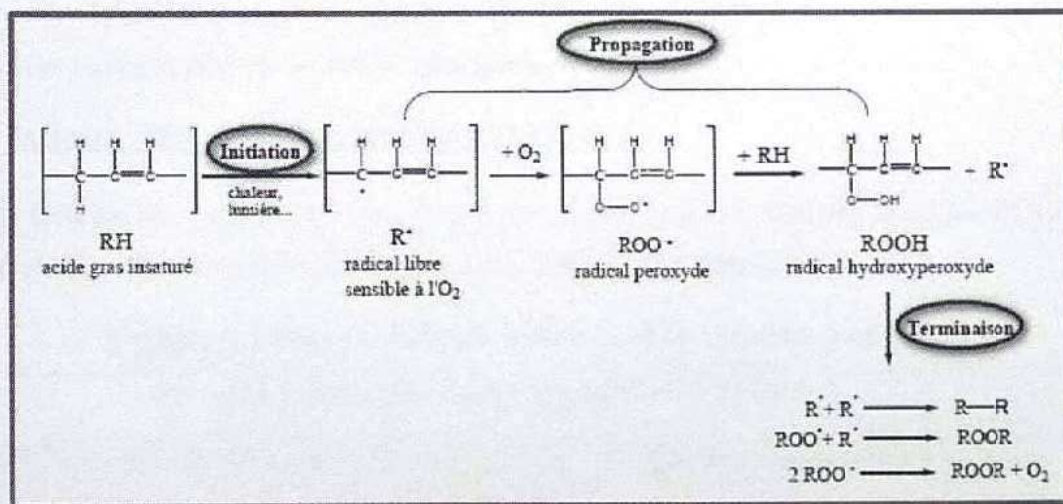


Schéma 2 : Oxydation d'un acide gras insaturé (Source : Moll et al, 1998)

2.2.3. Oxydation des protéines :

Les acides aminés des protéines sont la cible des espèces réactives de l'oxygène, soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydations, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne. Si la majorité des acides aminés peuvent être oxydés par ces espèces, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles. (Berlette et Stadtman, 1997)

L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des

réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements, leurs antigénicités et leurs activités (Valko et al, 2007).

Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (Jung et al, 2007).

2.2.4. Oxydation des Acides nucléiques :

Les modifications induites par des processus oxydatifs dans le matériel génétique appartiennent à quatre catégories : modification des bases (possibilité de dimérisation), cassure simple et doubles de la chaîne d'ADN, sites abasiques et pontage avec des protéines. Ces lésions sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques (létalité cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) et dans le vieillissement cellulaire. Dans la cellule l'ADN est en interaction avec de nombreuses protéines. Ces interactions sont non covalentes et réversibles. La formation de pontages covalents entre l'ADN et les protéines peut modifier l'expression des gènes et avoir ainsi de lourdes conséquences biologiques pour la cellule (Hochberg et al, 2006).

2.3 . Facteurs influençant l'oxydation des lipides :

Les facteurs qui influencent l'oxydation des lipides sont nombreux. Il s'agit de facteurs intrinsèques et des facteurs extrinsèques (Eymard, 2003; Prior, 2003).

Tableau 2: Pricipaux facteurs influençant l'oxydation des lipides :

Facteurs intervenant dans l'oxydation des lipides	
Facteurs intrinsèques	Facteurs extrinsèques
➤ Composition en acides gras des lipides ;	➤ Température (auto-oxydation) ;
➤ Nombre et position des insaturations ;	➤ Lumière (photo-oxydation)
➤ Présence de pro-oxydants et leur concentration tel que l'hème, les ions métalliques (auto-oxydation) ;	➤ Pression partielle en oxygène ;
➤ Enzymes (oxydation enzymatique);	➤ Activité de l'eau (a _w) ;
	➤ Conditions de stockage et de transformation.

(Sources: Eymard, 2003 ; Frankel et al, 1996 ; Prior, 2003).

2.4. Les antioxydants :

2.4.1 Définition des antioxydants :

Les antioxydants sont des substances qui, ajoutées à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, sont capables de supprimer, retarder ou empêcher les processus d'oxydation en augmentant le temps au bout duquel il y a une altération décelable du produit (Gunstone & Norris, 1983). Ils sont utilisés pour empêcher les aliments gras de rancir et pour protéger les vitamines liposolubles (A, D, E et K) contre l'oxydation.

Selon Moll *et al* (1998), les antioxydants sont des substances intervenant dans les processus d'oxydation des produits alimentaires dans le but d'empêcher ou de freiner l'action de l'oxygène moléculaire. Cette définition englobe un grand nombre de substances, y compris les enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, et aussi de petites molécules hydro ou liposolubles (tel que les vitamines).

2.4.2. Mode d'action des antioxydants :

L'action des antioxydants consiste en le piégeage des radicaux libres, ces radicaux ainsi inhibés devient non réactifs, c'est ce qu'on appelle l'action anti-radicalaire des antioxydants. En effet certains antioxydants de type phénolique réagissent selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin décrit comme suit : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de protons, pour donner un radical intermédiaire stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (Schéma 3).

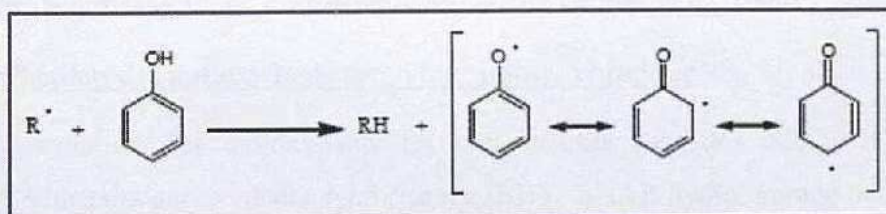


Schéma 3 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques

2.4.3. Classification des antioxydants selon leur mécanisme d'action

2.4.3.1. Groupe I.

Plusieurs noms ont été attribués à ce groupe par exemple, antioxydants primaires, chain-breaking, piègeur des radicaux libres. Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et de propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives.

Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques (ArH) capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire.

Les antioxydants de ce groupe réagissent de façon prédominante avec les radicaux peroxyyles, pour deux raisons : la concentration élevée de ces radicaux et la faible énergie du groupement (ROO.), en comparaison avec les autres radicaux comme le (RO.) et la faible concentration du piègeur du radical libre dans l'aliment. Un piègeur du radical libre, même à des concentrations faibles, entre en compétition avec les lipides pour rendre le radical libre inactif par l'intermédiaire d'une réaction de libération d'un électron, suivie d'une déprotonation (Frankel *et al*, 2000).

2.4.3.2. Groupe II.

Les composés de ce groupe sont considérés comme préventifs ou antioxydants secondaires. Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes et ne transfèrent pas le radical libre sous sa forme non-radicalaire. Avec quelques exceptions, les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation. Le groupe II inclut : des chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des désactivateurs de l'oxygène singulet, des piègeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative, enzymes anti oxydantes et destructeurs des hydro peroxydes.

Parfois, quelques antioxydants peuvent exercer plusieurs fonctions anti-oxydatives, par exemple, l'acide ascorbique peut être un piègeur du radical libre, désactivateur des oxygènes singulets dans une solution aqueuse et effectivement régénérer du tocophérol. Plusieurs flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux libres et chélateurs de métaux (Miller *et al*, 1996).

2.5. Classification des antioxydants selon leur nature chimique

Dans l'alimentation, les antioxydants les plus utilisés sont des composés phénoliques (chainbreaking). Plusieurs antioxydants synthétiques [BHT, BHA], hydroquinone de tertio- butyle (TBHQ) et gallate de propyle (PG) et quelques composés naturels (tocophérol, acide ascorbique, Béta-carotène) sont utilisés dans l'alimentation. Cependant, des études toxicologiques ont jugé certains antioxydants synthétiques comme sources de danger (Barlow, 1990; Evans *et al*, 1992). La recherche de nouveaux antioxydants naturels est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques. Dans la littérature, des milliers de publications ayant pour sujet les antioxydants naturels ainsi que leur effet sur l'organisme humain peuvent être consultées (Namiki, 1990; Wanasundara *et al*, 1994; Larson, 1997; Pietta, 2000; Moure *et al*, 2001).

Quelques produits naturels sont déjà exploités dans le marché (Schuller, 1990). Par exemple l'acide ascorbique, le tocophérol, l'huile de sésame, l'huile d'olive (Pratt, 1980; Taga *et al*, 1984; Altarejos *et al*, 2005; Perez-Bonilla *et al*, 2006).

Des recherches intensives sur plusieurs plantes ont été entreprises, plusieurs composés actifs ont été isolés et évalués comme étant des antioxydants. Dans la majorité des cas le composé actif est un composé phénolique (Cuvelier *et al*, 1992; Marinova *et al*, 1992; Chen *et al*, 1997), des isoflavones, ou phenylpropanoïdes, de l'acide phénolique (Cuvelier *et al.*, 1992; Marinova *et al*, 1992; Rice-Even *et al*, 1994; Chen *et al*, 1997), flavonoïdes (Rice-Even *et al*, 1994; Heilman *et al*, 1995; Pietta, 2000), isoflavones, catechine (Kanner *et al*, 1994), phenylpropanoïde, anthocyanidine (Wang *et al*, 1998), et chalcones.

La propriété anti oxydante des composés phénoliques est déterminée par sa richesse en électrons libres, ce qui implique une libération facile de cet électron suivie de la déprotonation de son groupe hydroxyle (Frankel *et al*, 2000).

Chez les plantes, les substances naturelles se trouvent sous forme de mélange complexe (métabolites secondaires), qui assure la protection de la plante contre le stress oxydatif dû aux effets synergiques ou additifs (Pratt, 1980; Moure *et al*, 2001). L'utilisation des extraits de plantes ou de fractions enrichies est devenue aujourd'hui une façon très attractive pour préserver les aliments. De plus, il a été démontré que plusieurs produits naturels (antioxydants) avaient des propriétés médicinales, par exemple : anti cancérigène, anti-inflammatoire (Madhavi *et al*, 1995). Cependant il faut contrôler le fait que le produit « naturel » soit inoffensif. Par exemple, on a démontré *in vitro* que quelques flavonoïdes peuvent être mutagènes (Sahu *et al*, 1993).

D'un point de vue général, un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques en rompant la chaîne des réactions radicalaires. Et d'un point de vue chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur ; il va donc pouvoir réagir avec un oxydant pour le neutraliser. Les antioxydants vont alors réduire les radicaux libres en annihilant ainsi leur action. Les antioxydants sont capables de stopper les réactions en chaîne décrites précédemment et empêchent donc la formation de molécules très réactives ou provoquent l'élimination de ces espèces avant l'endommagement des constituants de la cellule.

Tout organisme vivant possède un système d'antioxydants et d'enzymes qui agissent ensemble pour empêcher l'endommagement des composants des cellules comme l'ADN, les lipides et les protéines. Par exemple, notre organisme est capable de produire, à partir de l'acide aminé cystéine, un antioxydant puissant, l'acide alpha-lipoïque, conduisant aux sels (lipoates). De nombreux extraits de plantes, en particulier ceux qui sont riches en composés poly phénoliques, montrent certains effets antioxydants. Les plantes produisent de nombreux antioxydants pour se protéger, tels le glutathion, la vitamine C, la vitamine E, ou des enzymes telles que la catalase, le superoxyde dismutase et certaines peroxydases. Les fruits et les légumes sont bien connus pour être

riches en antioxydants. Les fruits notamment ceux dits rouges, tels les ailles, du fait de la présence conjuguée de vitamine C de lycopène et de poly phénols, et pour les légumes ayant la plus forte concentration en antioxydants ; on trouve la tomate, le cresson, l'ail, le chou vert, l'épinard, la betterave... Il faut savoir que lors de la cuisson de ces aliments, certains antioxydants tels que la vitamine C sont inactivés, alors que d'autres se transforment pour devenir plus actifs ou plus facilement absorbables par le système digestif.

2.6. Évaluation de l'activité anti oxydante

2.6.1. Généralités

Dans la littérature, plusieurs méthodes et techniques permettent de suivre l'état d'oxydation des lipides et d'évaluer l'activité anti oxydante (Ragnarsson *et al*, 1977; Namiki, 1990; Frankel, 1996). En principe, si un composé montre une faible activité anti oxydante *in vitro*, il est très rare qu'il présente une activité meilleure *in vivo* (Hanasaki *et al*, 1994). Les mécanismes d'oxydation et de prévention *in vivo* sont différents à cause de la perméabilité cellulaire et le processus de transport (Antolovich *et al*, 2002). Ces méthodes sont basées sur des phénomènes chimiques et des processus physiques Chromatographie GC, GC/MS, HPLC, ainsi que plusieurs techniques spectroscopiques UV/Visible, IR, Fluorimétrie, IRM, RMN...

La plupart des procédés analytiques exigent un prétraitement avant la mesure proprement dite. Ces méthodes couvrent l'ensemble des antis oxydants. La plupart des méthodes mesure un paramètre particulier en fonction du temps, d'autres méthodes enregistrent la vitesse d'oxydation (bombe à oxygène, gain de poids, mesure des radicaux libres par EPR). Pour diminuer le temps d'analyse, des températures élevées sont appliquées. Le stockage à température ambiante est toujours utilisé ; ainsi il est plus représentatif des circonstances de la vie réelle de l'aliment. Pour simplifier le protocole expérimental et pour faciliter les études théoriques, des systèmes modèles ont été élaborés comme le β -carotène bleaching test (Bocco *et al*, 1998). Quelques analyses permettent de mesurer la quantité du produit intermédiaire ou final généré par une oxydation (diènes conjugués, TBARS). A cause de la propriété essentielle de l'antioxydant (piégeur des radicaux libres), plusieurs méthodes ont été mises en place pour évaluer l'efficacité de l'antioxydant à piéger les radicaux libres (ABTS, DPPH).

2.6.2. Méthodes d'évaluation de l'activité anti oxydante

Les avantages et les limites des méthodes d'évaluation de l'activité anti oxydante ainsi que les références sont présentées dans le tableau 2. Il est clair qu'il serait difficile de développer une

méthode qui prenne en compte tous les paramètres et qui soit applicable sur tous les substrats et les antioxydants.

Tableau3: avantages et limites de quelques méthodes d'estimation de la stabilité des lipides et de l'évaluation de l'activité anti oxydante

Methodes	avantages	Limites	références
Test de stabilité (huiles/grasses)	<ul style="list-style-type: none"> •Gain de poids •Reproductibilité •Equipement simple 	<ul style="list-style-type: none"> •Faible sensibilité •Peu Performante •Formation de composés volatils affectant les résultats 	Wanasundara et al.,1994 ;Pokorny et al.,1997 ; Frankel.1998.
Bombe à oxygène	<ul style="list-style-type: none"> •reproductibilité excellente •mesure la vitesse d'oxydation •faible quantité d'échantillon 	<ul style="list-style-type: none"> •Température très élevées •Contamination élevée provenant du tissu en papier couvrant l'échantillon 	(Huang <i>et al.</i> , 2005)
Titration iodométrique	<ul style="list-style-type: none"> •Protocole analytique commun <input type="checkbox"/>•Précise <input type="checkbox"/>•ensibles 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/>•non adaptable au matériel biologique <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/>•possibilité d'oxydation d'iode 	Gebicki <i>et al.</i> , 1989; Takao <i>et al.</i> , 1994; Yen <i>et al.</i> , 1995; Zhang <i>et al.</i> , 1996)
TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)	<ul style="list-style-type: none"> •Simple <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/>•Sensible, surtout pour les lipides poly insaturés <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/>•Précise <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/>•utilisation de méthodes spectroscopiques simples <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/>•bonne corrélation avec l'analyse sensorielle des huiles végétales 	<ul style="list-style-type: none"> •pas trop sensible pour les lipides mono et di insaturés <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/>•les conditions de la réaction affectent le développement <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/>•grande influence des paramètres de la réaction (lumière, température, temps de chauffage, présence des ions métalliques ou des amines) <input type="checkbox"/><input type="checkbox"/>•protocole expérimental donnant parfois des artéfacts 	(Moller <i>et al.</i> , 1991; Yang <i>et al.</i> , 1991; Jacobson, 1993; Miura <i>et al.</i> , 1998)
bleaching test	<ul style="list-style-type: none"> •simple 	<ul style="list-style-type: none"> •non spécifique 	(Marco, 1968;

(β -carotène)	<input type="checkbox"/> •rapide <input type="checkbox"/> •sensible <input type="checkbox"/> •utilisation des méthodes spectroscopiques simple	<input type="checkbox"/> •influence des conditions expérimentales <input type="checkbox"/> •les données obtenues ne sont pas reliées directement à l'état d'oxydation actuel <input type="checkbox"/> •mécanisme d'oxydation pas clair	Miller <i>et al.</i> , 1993; Dapkevicius, 1998; Fukumoto <i>et al.</i> , 2000)
----------------------	--	--	--

3. Activité anti microbienne des huiles essentielles

3.1. Généralités

Les extraits aromatiques des plantes ont été utilisés depuis l'antiquité dans différentes formulations, comme médicaments et en parfumerie (**Heath, 1981**). Les huiles essentielles ont été considérées comme les agents antimicrobiens les plus efficaces présents dans ces plantes.

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction des huiles essentielles contenue dans les plantes. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances (**Essawi *et al.*, 2000**). Depuis deux décennies, des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans le domaine alimentaire. 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, 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 reconnus comme sains" (Generally Recognized As Safe Gras), ou approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug Administration (F.D.A.) ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments ; cependant, des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne.

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Sipailiene *et al*, 2006). Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudos -mycéliums alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

3.2. Mode d'action contre les bactéries

L'activité antimicrobienne des HE a fait l'objet d'un grand nombre de travaux à l'échelle internationale. Cependant, la majorité de ces travaux cités dans les publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité anti microbienne de ces HE. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des huiles essentielles. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est complexe et difficile à cerner à l'échelle moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

3.3. Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations. A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide.

3.3.1. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque)

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de cultureensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai.

Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible. La mesure manuelle des zones d'inhibition peut prendre du temps. Les dispositifs automatisés avec zone de lecture sont disponibles et peuvent être intégrés avec le rapport de laboratoire et les systèmes de manipulation de données. Les disques devraient être distribués également de sorte que les zones d'inhibition autour des disques antimicrobiens dans l'essai de diffusion en disque ne se chevauchent pas et que la zone d'inhibition puisse être déterminée.

Généralement cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose.

3.3.2. Technique en milieu liquide (méthode de dilution)

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/mL ou mg/litre). Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure immédiate.

3.3.2.1. La dilution en bouillon

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macro dilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de micro dilution. L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté, y compris les précisions sur les micro-organismes de référence approprié, peut faciliter la comparaison des résultats entre différentes analyses.

3.3.2.2. La dilution en gélose

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.



MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES**1. Matériel végétal****1.1. Les espèces étudiées**

Le matériel végétal (tableau n°4) est constitué de plantes des trois espèces récoltées dans différentes régions d'Algérie.

Tableau 4 : provenance des plantes étudiées

Plante	Espèce	provenance
Thym	<i>Thymus munbyanus</i>	Azazga (Tizi ousou)
Epazote	<i>Dysphania ambrosioides</i>	Arbatache(Boumerdes)
Férule	<i>Ferula vesceritensis</i>	Dhaya (Ghardaïa)

Pour les besoins des tests insecticides, environ deux kilogrammes de blé tendre biologique provenant d'un fellah de la région de Tizi-Ouzou ont également été utilisés comme substrat pour l'élevage des insectes.

1-2 Authentification des espèces

L'authentification des espèces a été réalisée par comparaison de nos échantillons aux spécimens existants à l'herbier de l'école nationale supérieure agronomique (ENSA) et confirmation de l'authenticité de chaque espèce par le professeur Abdelkrim Hassan du département de botanique de l'ENSA.

2. Matériel microbiologique :

On a utilisé quelques souches de la collection du CRD-SAIDAL pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE étudiées, ces souches ont été choisies pour leur pathogénicité et leur fréquence élevée de contamination; sauf pour *Saccharomyces cerevisiae* dont le choix vise à confirmer l'activité antifongique de nos échantillons. Ce sont des lots de « American Type Culture Collection » ATCC ; déposés par repiquage, avant chaque test, pour les purifier. Le tableau 6 résume la liste des souches microbiennes utilisées.

Tableau 5: Les souches utilisées dans l'étude antimicrobienne des H.E. :

La souche		Famille	Références ATCC*	Milieu de culture
Bactéries	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	Micrococcaceae 6538	Muller Hinton
		<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillaceae 9372	
	Gram-	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae 4157	
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae 4352	
Levures	<i>Candida albicans</i>		Cryptococcaceae 24433	Saboraud
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Saccharomycetaceae 2601	

(*) ATCC: American Type Culture Collection.

3. Matériel entomologique :

L'espèce utilisée est le charançon du riz (*Sitophilus oryzae*) dont la souche provient du laboratoire d'Entomologie de l'université de Tizi-Ouzou.

Un élevage de cette espèce à été mené dans le but de favoriser sa multiplication et d'assurer un nombre d'individus adultes suffisants et utiles pour effectuer les tests insecticides : deux bocaux en verre contenant 100 g de blé tendre biologique reçoivent chacun environ 30 individus puis sont mis dans une étuve réglée à une température de 30 ± 0.5 °C et une humidité relative de 70 ± 5 %

Les huiles essentielles et les extraits non volatils étudiés ont été extraits à partir des parties aériennes de la plante constituées par les feuilles les fleurs et/ou les tiges.

4. extraction des huiles essentielles

5. L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydro distillation à partir de la matière sèche des parties aériennes des plantes étudiées avec un appareil de

Clavenger modifié, au niveau du laboratoire de chimie de l'école nationale supérieure agronomique(ENSA)

5.1. Mode opératoire

Pour chaque extraction, une prise d'essai de 100 à 120g des parties aériennes (feuilles et sommités fleuries pour l'épazote et le thym et feuilles et tiges pour la fêrulle) sont introduites dans un ballon de deux litres rempli au 2/3 de sa capacité avec de l'eau. Ce dernier est ensuite mis en ébullition pendant 3à 4heures.

Le ballon chauffé à l'aide d'une calotte chauffante produit de la vapeur qui se charge de composés volatils qu'elle entraine avec elle .Cette vapeur se condense au contact du réfrigérant.

5.2. Récupération, purification et séchage des huiles essentielles

Le condensat est recueilli dans une ampoule à décanter et on sépare par différence de densité la phase aqueuse (partie inférieure) de la phase organique (partie supérieure) qui constitue l'huile essentielle. Après séparation l'huile essentielle est séchée sur un lit de sulfate de sodium anhydre(Na_2SO_4).L'huile séchée est ensuite conservée dans des flacons bruns fermés hermétiquement et conservé à une température de 4°C pour son analyse.

5.3. Rendement de l'extraction

On définit le rendement en HE de différentes manières. Dans ce travail nous avons considéré celui du rapport entre le volume de l'huile récupérée(VHE) et la masse de la matière végétale sèche(MV).

Le rendement en HE est exprimé en pourcentage et donné par la relation suivante :

$$\text{Rt (\%)} = \text{VHE}/100 \text{ g de MV}$$

6. Extraction à l'éthanol

6.1. principe

C'est une extraction solide-liquide, faite à chaud dans un soxhlet, réalisée au laboratoire de chimie de l'école nationale supérieure agronomique d'Alger (ENSA).

6.2. Mode opératoire

•Préparation de la matière végétale

Pour faciliter l'extraction des composés phénoliques, nous avons effectué les prétraitements suivants

‣-Séchage : Les plantes ont été séchées à l'air libre à température ambiante et à l'abri de la lumière.

‣-Broyage : après séchage, les feuilles et/ou les fleurs et/ou les tiges ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique à couteaux.

‣-Tamisage : le broyat a été tamisé à l'aide d'un tamis avec des mailles à diamètre inférieur à 1mm.

Les feuilles, les fleurs et les tiges des échantillons étudiés ont été broyées et réduites en poudre fine. 20g de poudre sont placées dans une cartouche et soumises à une extraction à chaud avec 100mL d'éthanol absolu. L'extraction est répétée jusqu'à épuisement (le solvant récupéré devient incolore).

‣-Le solvant riche en substances extraites, est récupéré dans un ballon rodé et évaporé à sec dans un évaporateur rotatif (rotavapor).

‣-L'extrait sec obtenu est pesé et conservé à 4°C pour son analyse.

6.3. Calcul du taux d'extraction :

Le taux d'extraction de chaque extrait des espèces étudiées est calculé selon la formule suivante :

$$TE\% = [(P_1 - P_0) / E] \times 100$$

Avec :

- TE : taux d'extraction (%) ;
- P₁ : poids du ballon après évaporation du solvant ;
- P₀ : Poids du ballon vide (g) ;
- E : Poids de la matière végétale utilisée (broyat) (g).

7. dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi ; depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux.

7.1. Principe

Le réactif de Folin- Ciocalteu (FCR) ou réactif de phénol de folin (connu aussi sous le nom de réactif de Folin-Denis) est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), en milieu basique, le réactif (FCR) oxyde les groupements oxydables des composés phénoliques présents dans l'échantillon; les produits de réduction (oxydes métalliques W_8O_{23} ; MoO_3), de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de phénols présents dans l'échantillon.

La quantification des phénols totaux a été établie par rapport à la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique. La teneur en phénols totaux a été exprimée en mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait obtenu.

7.2. Protocole

7.2.1. établissement de la courbe d'étalonnage

- On dilue la solution standardisée de l'acide gallique (0,4g/l) de manière à obtenir les concentrations suivantes : 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,4mg d'acide gallique dans un millilitre de solution.
- On dilue 0,5millilitre de chacune de ces solutions standardisées dans 10ml d'eau distillée, on ajoute 0,5ml de réactif de Folin-ciocalteu, on laisse reposer 3minutes, puis on ajoute 1mL d'une solution saturée de carbonate de sodium (Na_2CO_3) contenant 35g de Na_2CO_3 anhydre dans 100mL d'eau distillée, la couleur bleue apparaît.
- On mesure la densité optique (DO) des solutions standardisées avec un spectrophotomètre UV-Vis à 750nm.

7.2.2. Détermination de la teneur en composés phénoliques

- On dilue 0,5mL de chaque extrait éthanolique dans 10mL d'eau distillée, on rajoute 0,5mL de réactif de Folin-Ciocalteu, après 3mn on ajoute 1mL de la solution saturée de Na_2CO_3 ; on agite et on laisse la solution refroidir à l'obscurité pendant une heure jusqu'à apparition de la couleur bleue.
- On effectue la lecture des (DO) à 750nm.

7.3. Dosage des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes est estimée selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) modifiée (Lamaison et Carnet, 1990).

7.3.1. Principe :

Le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) forme un complexe avec les flavonoïdes dont on dose l'absorbance à 420 nm. Le flavonoïde standard utilisé dans cette méthode est la quercétine dont la formule chimique est la suivante :

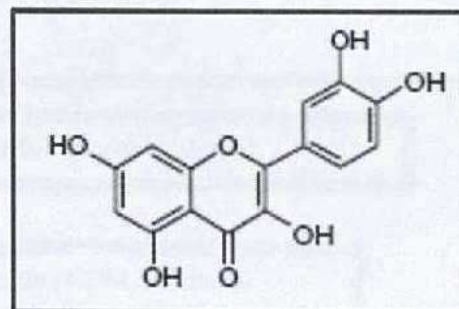


Figure 9 : La quercétine

7.3.2. Mode opératoire

- Ajouter 1 ml d'extrait dissout dans de l'éthanol 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 mg équivalent de quercétine par g d'extrait.

6.4. Détermination de la concentration inhibitrice de 50 % des radicaux (IC_{50})

Elle est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants (huile essentielle ou toute autre substance utilisée comme antioxydant) nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50 % des radicaux. En d'autres termes, c'est la concentration nécessaire pour obtenir une activité en pourcentage égale à 50. Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant.

8. Mesure du pouvoir réducteur :

8.1. Principe :

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles et des extraits représente l'aptitude de ces composés à réduire le fer ferrique en fer ferreux. Cette aptitude est évaluée par la méthode décrite par Oyaizu (1986).

8.2. Mode opératoire :

L'estimation du pouvoir réducteur des échantillons étudiés (huiles essentielles, extraits et BHT) est obtenue selon le protocole expérimental décrit dans le schéma qui suit. L'augmentation de l'absorbance indiquera une augmentation du pouvoir réducteur. Le test a été répété 3 fois pour chaque concentration de chaque échantillon étudié.

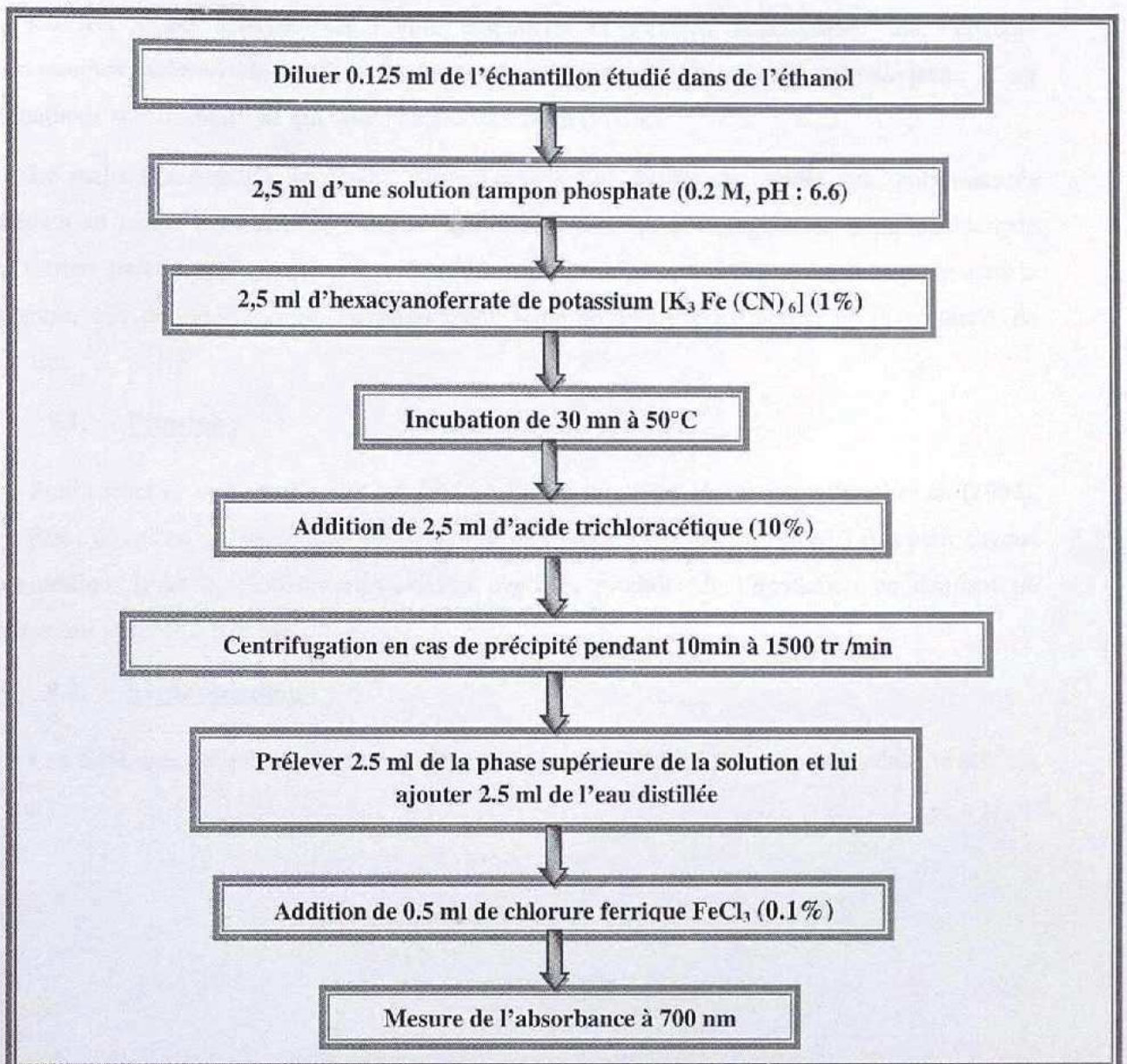


Schéma 4 : Test du pouvoir réducteur

9. Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) :

Ce test a été effectué sur l'huile essentielle et l'extrait éthanolique de l'épazote (*Chenopodium ambrosioides*) et de la ferule (*ferula vesceritensis*) uniquement au stade jeune. C'est une méthode spectrométrique qui dose le malonaldéhyde (MDA).

Le malonaldéhyde est un produit secondaire de l'oxydation des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons. L'acide thiobarbiturique réagit avec le malonaldéhyde pour former un composé qui absorbe à **532–535 nm**. Divers protocoles ont été mis au point dans la littérature, ces derniers varient essentiellement selon le mode d'extraction et la méthode de détection.

9.1. Principe :

Pour mener ce test, nous avons adopté la méthode modifiée décrite par **Miguel et al. (2004)**, où le jaune d'œuf est utilisé comme substrat riche en lipides. Le test a été répété 3 fois pour chaque concentration. L'acide thiobarbiturique réagit avec les produits de l'oxydation en donnant un pigment qui absorbe à **532 nm**.

9.2. Mode opératoire :

Les différentes étapes de la mise en œuvre du test de TBARS sont résumées dans le schéma suivant :

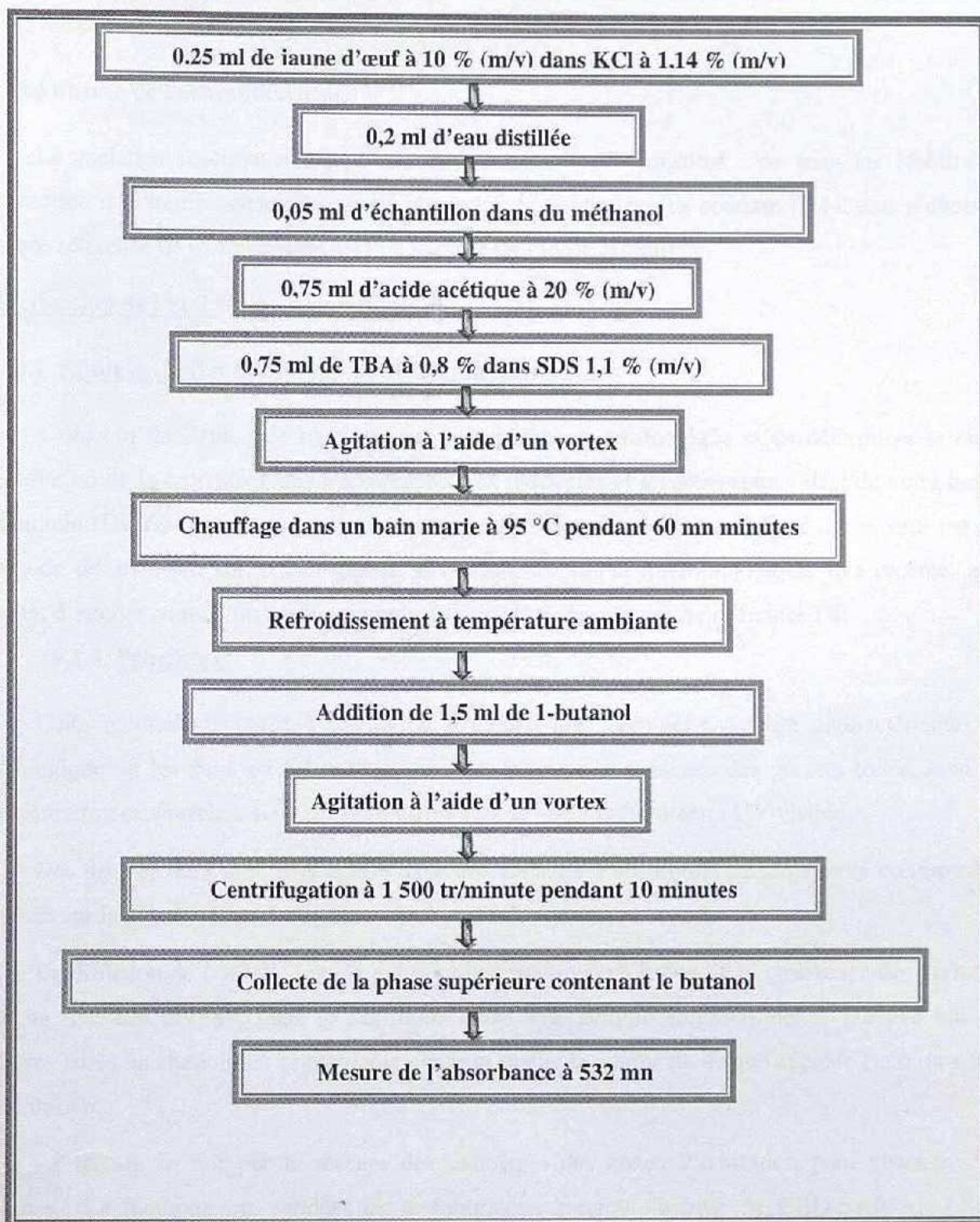


Schéma 5 : Protocole de mise en œuvre du test TBARS

La capacité d'inhibition de la peroxydation I en % (pourcentage d'activité anti oxydante) est calculée selon la formule suivante :

$$I (\%) = (1 - T/C) \times 100$$

C : absorbance du témoin complètement oxydé (absorbance du témoin négatif).

T : absorbance de l'échantillon testé.

Le mélange réactionnel relatif au témoin négatif est constitué de tous les réactifs à l'exception de l'huile essentielle, tandis que celui du témoin positif contient la substance choisie comme référence de comparaison (BHT) à la place de l'huile essentielle.

9. Évaluation de l'activité antimicrobienne :

9.1. Étude de l'effet inhibiteur (analyse qualitative) :

L'objectif de l'étude de l'activité antimicrobienne et antifongique et de déterminer le taux d'inhibition de la croissance des microorganismes (bactéries et levures) sous l'effet de notre huile essentielle (HE *ferula vesceritensis* Coss et Dur., H.E *thymus munbyanus* Desf....) et ceci par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. C'est une technique microbiologique, très récente, qui permet d'étudier comme un antibiogramme la sensibilité des germes à différentes HE.

9.1.1. Principe :

Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antibactérienne et antifongique ou les deux en même temps, en les mettant en présence des germes testés, dont la concentration est ajustée à 10^7 - 10^8 germes/ml avec le spectrophotomètre UV visible.

Des disques de 9 mm de diamètre avec une capacité d'absorption de la quantité précise sont déposés sur la géloseensemencée en nappe à partir des souches à tester.

La diffusion de ces HE, dans la gélose va permettre l'inhibition de la croissance des germes, tout au tour des disques, dans le cas d'une éventuelle activité antimicrobienne positive qui se traduira après incubation par une auréole claire et distincte autour du disque appelée Halo ou zone d'inhibition.

La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition pour chacune des souches. (La méthode est validée par le laboratoire microbiologique de CRD-SAIDAL). Son principe est tiré du titrage des anti-microbiologiques (**Pharmacopée européenne, 2002**).

9.1.2. Protocole expérimental:

9.1.2.1. Préparation de la première couche du milieu :

- Faire fondre les milieux Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures dans un bain-marie réglé à 95 °C.

- Verser aseptiquement une première couche des deux milieux dans des boîtes de pétrie de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte avec 3 répétitions par souches.
- Laisser refroidir et solidifier sur paillasse.

9.1.2.2. Préparation de l'inoculum :

À partir de jeunes cultures (18 h à 24 h pour les bactéries et 48 h pour les levures) :

- Réaliser des suspensions microbiennes qu'on dépose dans 9 ml d'eau physiologique stérile.
- Agiter au vortex.
- Réaliser une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm en estimant la transmutante entre 22 et 32 % (0.02 à 0.03) pour les bactéries sauf pour *Staphylococcus aureus* qui doit être comprise entre 30 et 40 % (0.03 à 0.04) et entre 2 et 3 pour les levures.

Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessous correspondent à une concentration optimale de $10^7 - 10^8$ germes/ml, si une des valeurs trouvées à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle, on l'ajuste en ajoutant de l'eau physiologique si elle est supérieure à la valeur maximale ou en ajoutant les colonies si elle est inférieure à la valeur minimale. À chaque fois, une nouvelle lecture de transmutante est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées. L'inoculum doit être utilisé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

9.1.2.3. Préparation de la deuxième couche du milieu :

- faire fondre les deux milieux MH et SAB.
- Laisser refroidir jusqu'à une température de 45 °C.
- Mettre dans des flacons de 50 ml le milieu correspondant pour chacune des souches.
- Ensemencer les milieux avec 20 µl de la suspension.
- Agiter manuellement puis déposer rapidement 4 ml de chaque milieu ensemencé sur la surface de la première couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme.
- Laisser solidifier sur la paillasse

9.1.2.4. Dépôt des disques :

- Prélever à l'aide d'une pince stérile.

- À l'aide d'une micropipette, on met avec l'HE à tester en mettant en contact seulement le bout des disques, et celle-ci va être absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque.
- Disposez-les sur la surface de la gélose.
- Laissez diffuser pendant 30 min.
- Incuber à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries et à 25 °C pendant 48 h pour les levures.

Cette technique est illustrée par la figure suivante :

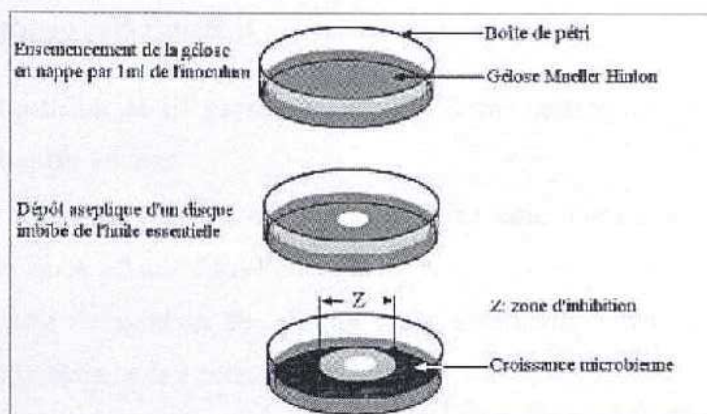


Figure10 : Illustration de la méthode d'aromatogramme.

9.1.2.5. Lecture :

- ✓ Présence de zone claire autour du disque → présence d'activité inhibitrice.
- ✓ Absence de zone claire autour du disque → absence d'activité inhibitrice.

9.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide :

9.2.1. Principe:

Les concentrations minimales inhibitrices sont définies comme la dernière ou la plus basse concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un microorganisme après 24 h l'incubation pour les bactéries et 48h pour les levures.

Cette CMI a été déterminée selon la méthode de dilution dans un milieu gélosé (Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures).

9.2.2. Dénombrement des germes :

- Réaliser des cultures bactériennes, dans le milieu MH liquide ou le bouillon nutritif.

- Incuber pendant 18 h pour avoir la phase exponentielle.
- Réaliser une série de dilutions allant jusqu'à 10^{-4} en prélevant 1 ml de la suspension mère qu'on verse dans 9 ml d'eau distillée stérile, ceci nous donne la dilution 10^{-1} .
- Effectuer de la même façon pour obtenir les autres dilutions (10^{-1} ,... 10^{-4}).
- Ensemencer en surface (étalement) chaque dilution sur une boîte Pétri, contenant de la gélose nutritive à raison de 2 boîtes par dilution.
- Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures.

9-2-3-Protocole expérimental :

- Préparer une suspension de 10^4 germes/ml à partir d'une culture microbienne de 24 h pour les bactéries et 48 h pour les levures.
- Liquéfaction de 200 ml du MH et SAB à 95°C dans un bain-marie ; en lui additionnant 1 ml de tween 80, puis on le laisse 10 min dans l'étuve à 45°C .
- Préparer une série de dilution de chaque huile essentielle allant jusqu'à 0,03 %. La réalisation des dilutions se fait comme suit :
 - ✘ 1 ml d'huile essentielle est diluée dans 50 ml de milieu dans un premier flacon ce qui donne une dilution de 2 % (2 ml d'huile essentielle dans 100 ml du milieu)
 - ✘ Verser la moitié du 1^{er} flacon dans un 2^{ème} flacon et ajuster avec 25 ml de milieu pour la dilution de 1 %.
 - ✘ Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0,03 %.
 - ✘ Verser chaque dilution sur une boîte de Pétri.
- Laisser les milieux solidifier.
- Ensemencer les boîtes par spotage à l'aide d'une micro seringue à raison de 1-2 μl des suspensions microbiennes de 10^4 germes/ml.
- Préparer les boîtes témoin (positif) contenant le MH et SAB avec tween 80 sans huile essentielle.

10 . Étude comparative de l'activité insecticide des huiles essentielles de la fêrula et du thym :

Afin de déterminer le degré de toxicité de l'huile essentielle de la plante étudiée *Ferula vesceritensis* Coss.et dur. sur *sitophilus oryzae* (charançon du riz), et de le comparer avec celui du *Thymus munbyanus* Desf, nous avons utilisé deux modes de pénétration : contact et inhalation, dont le paramètre contrôlé est la mortalité des insectes. Le but de notre étude est de comparer

l'efficacité des deux huiles essentielles d'une part, et de déterminer le mode d'action le plus propice à utiliser dans une éventuelle lutte.

10.1. Fixation des doses et choix du solvant des solutions des huiles essentielles :

Pour effectuer les tests insecticides, on a préparé plusieurs dilutions pour chaque huile essentielle. Les doses utilisées pour la plante *F. vesceritensis* sont choisies sur la base des essais préliminaires, vu l'absence de tels travaux précédents sur la même plante, alors que pour le thym *T. munbyanus* on s'est référé aux travaux de Maafi 2005.

À partir d'une dose initiale de 4 $\mu\text{l/ml}$ correspondants à 0.063 $\mu\text{l/cm}^2$ pour *F. vesceritensis*, et de 6 $\mu\text{l/ml}$ correspondants à 0.094 $\mu\text{l/cm}^2$ pour *T. munbyanus* nous avons choisi trois autres doses plus grandes suivant une progression géométrique de raison $R=2$ comme le montre le tableau suivant :

Tableau 6: Doses choisies pour chaque huile essentielle.

Huile essentielle	Famille botanique	Doses choisies exprimées en μl de H.E./ml de solvant	Doses correspondantes en $\mu\text{l/cm}^2$ sur boîte de pétri
<i>Ferula vesceritensis</i> Coss.	Apiaceae	4	0.063
		8	0.126
		16	0.251
		32	0.503
<i>Thymus munbyanus</i> Boiss.	Lamiaceae	6	0.094
		12	0.189
		24	0.377
		48	0.754

Le solvant choisi pour la préparation des dilutions est l'acétone pour ses différentes vertus, à savoir :

- ✓ évaporation très rapide ;
- ✓ Absence d'effets résiduels ;
- ✓ Solubilisation complète et rapide (solutions homogènes) ;
- ✓ Inertie chimique vis-à-vis des H.E. et des matériaux utilisés. (Papier-filtre, verre...)

Ce solvant a été utilisé uniquement dans le test de toxicité par contact pour assurer une meilleure diffusion de l'H.E. dans le papier filtre de façon homogène.

10.2. Tests de toxicité des huiles essentielles sur *Sitophilus oryzae* :

10.2.1. Évaluation de la toxicité des huiles essentielles par contact :

Nous avons opté pour la méthode d'imprégnation du papier filtre par les solutions de l'huile essentielle. Cette technique semble la plus utilisée dans les tests de toxicité par la majorité des auteurs tels que **Khalfi-Habes O. et al. 2010**, et **Ndomo A.F. et al. 2009** où les insectes sont mis en contact direct avec les substances actives. Dans ce test la dose en huile essentielle et le temps de l'exposition sont variables et pour ce faire nous avons suivi les étapes suivantes :

➤ **La sélection des individus d'âge connu :**

À partir de l'élevage de masse de *Sitophilus oryzae* réalisé au préalable sur blé tendre biologique (voir Matériel entomologique), on a sélectionné des individus d'âge connus : 15 jours. Ceci est obtenu par tamisage du blé infesté (le substrat de l'élevage des insectes) de manière à éliminer tous les insectes adultes, puis réintroduire le blé tamisé, qui ne doit contenir que des larves à l'intérieur des grains, dans l'étuve réglée à la température de 30 ± 0.5 °C et une humidité relative de 70 ± 5 %. Après 15 jours, les individus obtenus mâles et femelles sont donc d'âge connu.

➤ **Préparation des solutions d'huiles essentielles :**

Pour chaque huile essentielle, on a préparé quatre dilutions dans 50 ml d'acétone suivant les doses fixées comme suit : Au fond de quatre fioles jaugée de 50ml, on injecte par une micropipette des quantités calculées d'H.E. ;

- On ajuste avec de l'acétone jusqu'au trait de jauge ;
- On bouche les fioles et on homogénéise le mélange acétone-H.E.

➤ **Imprégnation du papier filtre :**

- On pose aseptiquement des disques de papier-filtre Whatman de 9cm de diamètre au fond de 20 boîtes de pétri en verre ayant le même diamètre (20 pour chaque H.E.);
- À partir de chaque solution d'H.E. on prélève 1ml à l'aide d'une micropipette que l'on injecte au centre d'un disque de papier filtre, celui-ci absorbe très rapidement et uniformément la solution. On effectue quatre répétitions par dilution ; On réalise aussi quatre répétitions pour le témoin, mais en utilisant le solvant seulement (1 ml), ce témoin va servir ultérieurement pour la correction des résultats et effectuer l'analyse statistique ;
- On laisse le solvant s'évaporer complètement avant de fermer les boîtes.

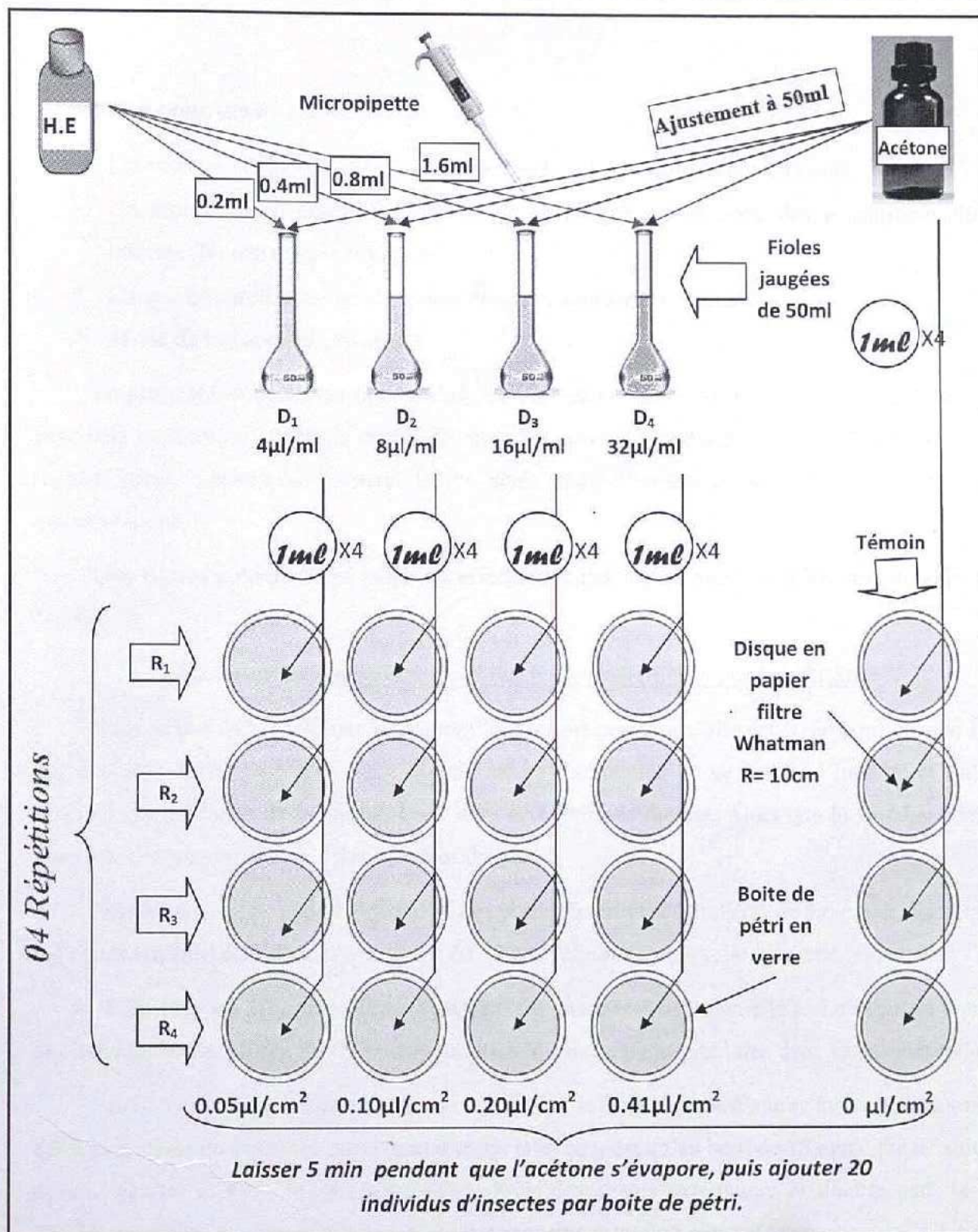


Schéma 6 : mise en œuvre du test de toxicité par contact
(les quantités illustrées correspondent à celle de la fêrulle)

Mise en boîte des insectes :

- Les insectes adultes de 15 jours sont récupérés soigneusement sous un tamis.
- On procède à un échantillonnage de façon aléatoire pour avoir des échantillons de 20 insectes (les deux sexes confondus) ;
- Chaque échantillon est mis dans une boîte qui sera fermée aussitôt.

➤ Mode de lecture des résultats :

Le paramètre contrôlé est la mortalité, c'est-à-dire le nombre d'individus morts par boîte. Et pour cela nous avons adopté le critère de mortalité suivant : l'individu est considéré mort s'il ne montre aucun mouvement corporel même après chatouillement de ses pattes par une pince entomologique.

Une lecture à l'aide d'une loupe est effectuée toutes les 24 heures pendant une période de 8 jours.

10.2.2.Évaluation de la toxicité des huiles essentielles par inhalation :

Dans le test de toxicité par inhalation, la dose est constante, elle est fixée pour chaque H.E. par des tests à blanc de telle sorte qu'elle sature l'ambiance où se trouve l'insecte, et qu'elle entraîne une évolution de la mortalité au cours de la période du test. Alors que la variable étant le temps de l'exposition des insectes à l'odeur de l'H.E.

Pour mener ce test nous avons utilisé des pots cylindriques (piluliers) de 3.6 cm de diamètre et 6.3 cm de hauteur, soit un volume total de 64.13 cm^3 , et nous avons suivi les étapes suivantes :

➤ **Effectuer un échantillonnage aléatoire** des insectes tous comme le test de contact à partir des individus ayant un âge de 15 jours pour avoir des lots de 20 insectes (les deux sexes confondus).

Le choix de cet âge est fait d'une part pour éviter toute influence d'autres facteurs, notamment liés à la biologie de l'insecte, sur la mortalité, en effet ce n'est qu'au bout de 15 jours que la cuticule devient épaisse et acquiert sa résistance vis-à-vis des agents extérieurs ; et d'autre part, le fait d'avoir des individus très âgés (vieux) va entraîner une mortalité naturelle excessive qui n'a rien à voir avec l'effet toxique de l'huile.

➤ Imbiber des bouts de coton avec une quantité d'huile essentielle : 16 μl pour l'H.E. de *F. vesceritensis* et 24 μl pour l'H.E. de *T. munbyanus*, puis les déposer dans la face interne des couvercles, le témoin est réalisé sans aucun traitement (on a mis un bout de coton intact).

- Afin d'empêcher les insectes de se mettre en contact avec les substances actives on place une moustiquaire fine sur l'ouverture des pots avant de les fermer hermétiquement.
- On garde les pots -contenant du coton imbibé d'H.E.- fermés un laps de temps suffisant pour saturer l'atmosphère interne (10 min environ), puis on introduit rapidement 20 insectes par pot.
- On a choisi quatre temps de lecture qui varient suivant une progression géométrique de raison 2 à partir de 24 heures, soit 24, 48, 96, puis 192 heures, et on a réalisé 4 répétitions pour chaque temps et pour le témoin (pour chaque H.E.).

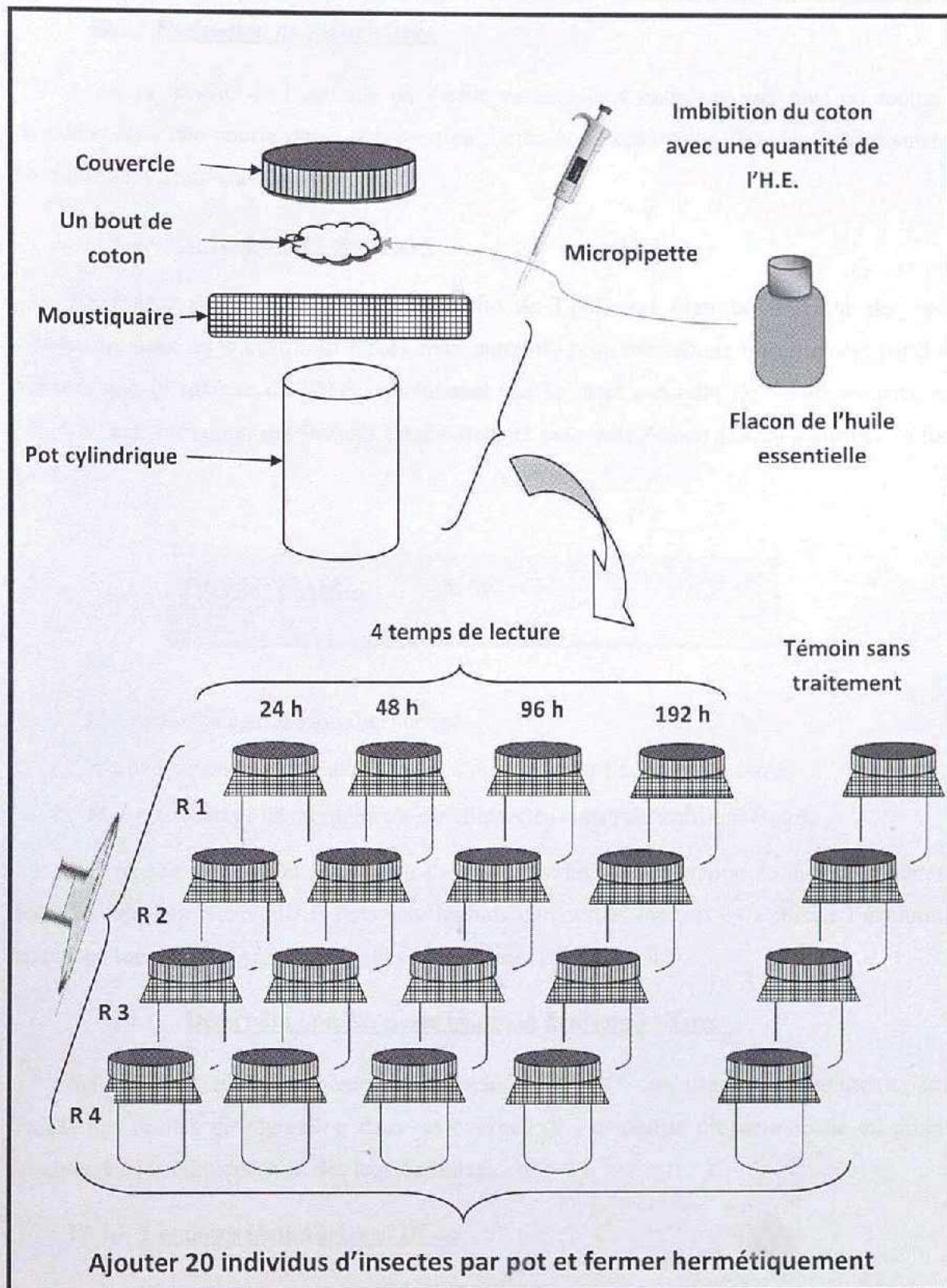


Schéma 7 : Mise en œuvre du test d'inhalation

(Les temps de lecture indiqués correspondent à ceux de la férule)

10.2.3. Évaluation de l'effet-choc :

C'est la mesure de l'aptitude de l'huile essentielle à entraîner une plus ou moins forte mortalité dans une courte durée d'exposition ; ainsi la détermination des dose qui donnent une mortalité significative avant 24 heures.

10.2.4. Expression des résultats :

Le critère adopté pour juger l'efficacité de l'H.E. est bien la mortalité des insectes. Cependant, dans les échantillons traités cette mortalité peut être induite partiellement par d'autres facteurs que la toxicité de l'H.E., notamment par la mort naturelle (le vieillissement), ce qui nécessite une correction des lectures de résultats, et pour cela Abbott (1925) a attribué la formule suivante :

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

Où :

- ✓ MC : pourcentage de mortalité corrigé
- ✓ M : pourcentage de mortalité moyen d'insectes dans l'échantillon traité.
- ✓ M_t : pourcentage de mortalité moyen d'insectes dans l'échantillon témoin.

Les résultats de l'effet insecticide des deux modes de pénétration étudiés sont représentés dans des tableaux récapitulatifs puis sont traduits en courbes mettant en évidence l'évolution des probits en fonction des variables étudiés (dose, temps d'exposition).

10.3. Détermination des doses létales et des temps létaux :

Selon Finney 1971, les valeurs des doses létales et des temps létaux sont déduites à partir des tracées des droites de régression dans les courbes de l'évolution proportionnelle en probits en fonction des logs des doses ou des logs des temps.

10.3.1. Les doses létales DL_{50} et DL_{90} :

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

10.3.2. Les temps létaux TL_{50} et TL_{90} :

Nous avons aussi calculé les temps létaux TL₅₀ et TL₉₀ qui reflètent les temps au bout desquels on observe une mortalité de 50 % et 90 % respectivement de l'échantillon traité sous l'action du toxique à une concentration bien déterminée. Ces valeurs sont tirées des droites de régression des tests inhalation de chaque huile essentielle.

11. Analyse statistique :

Les résultats de l'évaluation de l'activité anti oxydante et insecticide des huiles essentielles et des extraits des plantes étudiées ont été soumis à une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA 2) avec un seuil de signification fixé de 5 % à l'aide du logiciel de statistique **SPSS 10.0**. Cette analyse a été effectuée comme suit :

✓ Pour l'activité anti oxydante :

Tester l'effet de la dose de la substance active et du stade phénologique de la plante sur le taux de la réduction du radicale libre DPPH, le pouvoir réducteur et sur le test TBARS.

✓ Pour l'activité antimicrobienne :

Tester l'effet de la dose et le type de l'huile essentielle sur le diamètre d'inhibition des germes étudiés.

✓ Pour l'activité insecticide :

Tester l'effet de la dose et la durée d'exposition des huiles essentielles sur le taux de mortalité de l'insecte étudié, ainsi que l'étude de l'effet de ces huiles essentielles à différentes doses par différents tests et en tirer le meilleur moyen de lutte à envisager (voir annexe).

Les représentations graphiques illustrées dans ce document ont été réalisées au moyen des logiciels **SPSS 10.0** et **Microsoft Office Excel 2007**.

12. Caractérisation des huiles essentielles

La caractérisation d'une huile essentielle consiste à :

- apprécier ses caractéristiques organoleptiques.
- Déterminer ses indices physiques (densité, indice de réfraction ...)
- Avoir son profil chromatographique et une quantification relative de ses constituants.

12.1. caractéristiques organoleptiques

L'appréciation organoleptique des huiles essentielles nécessite l'utilisation de nos sens afin d'évaluer l'aspect, l'odeur, la couleur ainsi que la flaveur de ces dernières.

12.2. Caractéristiques physiques

Ce sont ceux indiqués par le recueil des normes de l'association française de normalisation (AFNOR).

• **Densité relative à 20°C : d_{20}^{20}** (NFT 75-111)

• **Indice de réfraction à 20°C : n_D^{20}** (NF T-112).

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

n_D^T est la valeur de la lecture obtenue à la température T°C

13. Analyse qualitative et semi quantitative des huiles essentielles par GC et GC/MS

13-1 : Analyse qualitative des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (GC) :

• L'analyse qualitative par GC des échantillons des trois huiles essentielles a été effectuée au laboratoire d'analyse instrumentale du département de technologie alimentaire et nutrition humaine de l'école nationale supérieure agronomique d'El-Harrach (ENSA), selon les conditions opératoires ci-dessous.

Appareil CP chrompack 9002.

Colonne capillaire stabilwax de phase stationnaire polyethylene glycol (PEG)-longueur : 30m ; diamètre interne : 0,32mm ; épaisseur de la phase : 0,25µm.

Température de la colonne 50°C en isotherme pendant 3minutes puis programmation de la température à raison de 2°C/mn jusqu'à 220°C, puis maintenu fixe pendant 15mn.

Injection en mode split avec un rapport de division de 1/50.

Température de l'injecteur 250°C.

Température du détecteur (FID) 280°C.

Pression 30KPascal.

Gaz vecteur Azote N₂.

Débit gaz vecteur : 1mL/mn.

Volume injecté : 0,2µl.

• L'identification des composés s'est faite par la comparaison de leurs indices de rétention (indices de Kovats) à ceux cités par la littérature et à ceux d'étalons injectés dans les mêmes conditions.

Pour le calcul des indices, on injecte un mélange d'alcane ($C_7 - C_{24}$) dans les mêmes conditions opératoires que nos échantillons.

Les indices de Kovats (I_K) sont calculés selon la formule suivante :

$$I_K = 100z + 100n \cdot [(t_{Rc} - t_R) / (t_{Rz+n} - t_{Rz})]$$

t_{Rc} : temps de rétention du composé étudié (mn).

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

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

n : différence des nombres d'atomes de carbone.

13.2. Analyse semi quantitative des huiles essentielles par GC/MS

Cette analyse a été faite au laboratoire du Centre de recherche en analyse physico-chimiques (CRAPC) selon les conditions opératoires suivantes :

Chromatographe :

Appareil de type GC 6890 série GC systems (HP Agilent Technologies).

Colonne HP5-MS (5% phenylmethylpolysiloxane) d'une longueur de 30m, d'un diamètre interne de 0,25mm et d'une épaisseur du film de la phase de 0,25µm. Température de la colonne 35°C en isotherme pendant 2mn puis en programmation de température à raison de 5°C/mn jusqu'à 320°C.

Injection en mode split, température de l'injecteur : 250°C.

Température du détecteur 280°C « interface ».

Pression 6,75 psi.

Gaz vecteur helium (He).

Débit du gaz vecteur : 1ml/mn.

Volume injecté : 0,2µl.

Spectromètre de masse :

Appareil de type MS-5973 N (HP Agilent Technologies).

Mode de détection Scan : 30-550 amu.

Potentiel d'ionisation : 70eV.

Pression (source, analyseur) :6,75psi.

13.3. Mode d'identification

L'identification des constituants de nos huiles essentielles s'est faite par :

La comparaison des spectres de masse des molécules des composés inconnues à ceux des composés purs fournis par la base de donnée Wiley 7N utilisée par le logiciel «Enhanced chemstation » et en tenant compte de l'ordre d'élution du composé sur la colonne considérée.



RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS**I- Caractéristiques des huiles essentielles****1. Cas de l'huile essentielle du thym****1.1. Caractéristiques organoleptiques et physiques de l'huile**

Les caractéristiques physiques et organoleptiques de l'huile essentielle de *thymus munbyanus* sont résumées dans le tableau suivant.

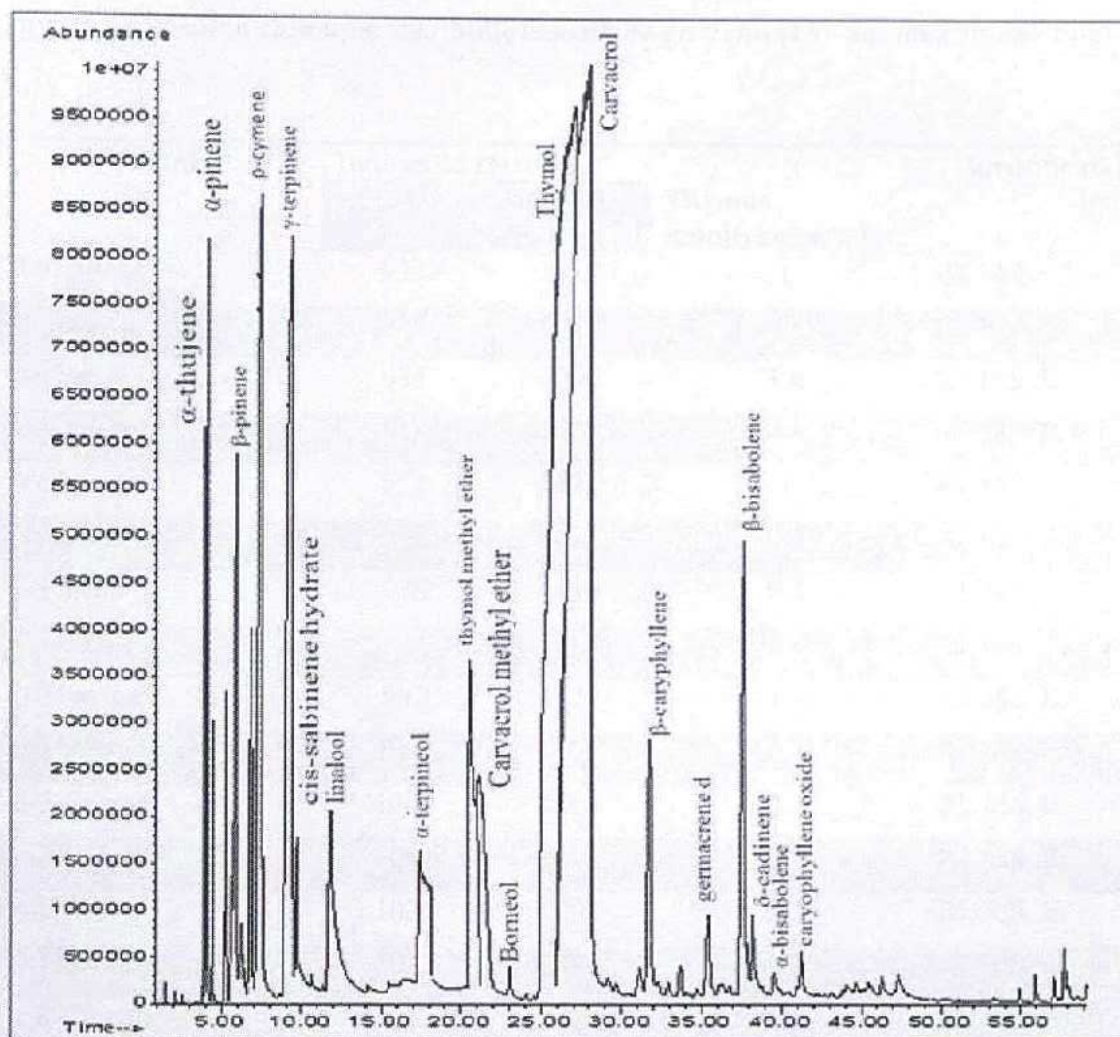
Tableau7 : caractéristiques physiques et organoleptiques de l'huile essentielle de *thymus munbyanus* Boiss.et Reut.

Caractéristiques		Huile essentielle de <i>thymus munbyanus</i> d'Azazga (Tizi-ouzou).
Organoleptiques	Aspect	liquide
	Couleur	jaunâtre
	Odeur	Aromatique, phénolique avec un fond épicée
Physiques	Indices de réfraction à 20°C (n_D^{20})	1,4980
	Densité relative à 20°C (d_{20}^{20})	0,9210

1.2. Composition chimique de l'huile essentielle du thym : (*Thymus munbyanus*).

L'identification des composés de l'huile essentielle par GC et GC/MS a été essentiellement basée sur la comparaison des spectres de masse de la molécule inconnue à celui d'un composé pur fourni par la base de données informatique.

L'analyse par GC seule et GC/MS de l'HE de *T. munbyanus* provenant d'Azazga (Tizi-Ouzou) nous a permis d'identifier 48 composés représentant 93% de la composition totale.



Chomatogramme de *Thymus munbyanus* sur colonne HP5MS

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation pour *Thymus munbyanus*, le rendement d'extraction exprimé en ml/100 g de matière végétale sèche est de : **2,3 %**. Ce rendement est légèrement inférieur à celui obtenu par **Chikhoun** (2007) qui est de 2,8 % pour la même espèce.

Tableau 8 : Composition chimique de l'huile essentielle du thym (*Thymus munbyanus* Boiss.et Reut.).

N°	Composés ^[1]	Indices de rétention ^[2]		Thymus munbyanus(%)	Identification ^[3]
		HP5MS	Stabilwax (PEG)		
2	Tricyclene	923	1017	t	RI, MS
3	α -Thujene	925	1029	0.8	RI, MS, E
4	α -Pinene	935	1026	1.4	RI, MS, E
5	Camphene	948	1072	0.3	RI, MS, E
6	Verbenene	953	1121	t	RI, MS
7	Sabinene	972	1132	0.2	RI, MS, E
8	β -Pinene	976	1119	0.4	RI, MS, E
9	1-Octen-3-ol	982	1411	0.4	RI, MS
11	β -Myrcene	992	1173	1.9	RI, MS, E
13	α -Phellandrene	1007	1177	0.3	RI, MS, E
14	δ -3-Carene	1009	1163	0.1	RI, MS, E
16	α -Terpinene	1017	1192	1.4	RI, MS, E
17	p-Cymene	1026	1290	5.1	RI, MS, E
19	β -Phellandrene	1030	1222	0.3	RI, MS
20	1,8-Cineole	1033	1223	0.2	RI, MS, E
22	(E)- β -Ocimene	1048	1272	t	RI, MS
23	γ -Terpinene	1061	1261	7.0	RI, MS, E
24	cis-Sabinene hydrate	1069	1567	0.3	RI, MS
26	Terpinolene	1087	1300	t	RI, MS, E
28	trans-Sabinene hydrate	1099	1482	t	RI, MS
29	Linalool	1104	1554	1.7	RI, MS, E
33	Camphor	1144	1556	t	RI, MS
34	Borneol	1167	1732	0.1	RI, MS, E
36	α -Terpineol	1194	1723	7.6	RI, MS, E
39	Thymol methyl ether	1235	1611	2.8	RI, MS
41	Thymol	1302	2212	18.5	RI, MS, E
42	Carvacrol	1318	2238	35.2	RI, MS, E
51	α -Gurjunene	1403	1549	0.1	RI, MS
53	β -Caryphyllene	1415	1612	1.6	RI, MS, E

54	β -Gurjunene	1426	1532	0.1	RI, MS
55	α -Bergamotene	1435	1563	0.1	RI, MS
58	α -Humulene	1450	1687	0.2	RI, MS
60	trans- β -Farnesene	1453	1665	0.1	RI, MS
61	allo-aromadendrene	1457	1663	t	RI, MS
63	Germacrene D	1477	1726	0.6	RI, MS, E
64	α -Curcumene	1479	1790	0.1	RI, MS
70	α -Muuroolene	1495	1740	0.1	RI, MS
71	β -Bisabolene	1505	1748	3.0	RI, MS
74	δ -Cadinene	1518	1772	0.4	RI, MS
75	β -Sesquiphellandrene	1525	1768	0.1	RI, MS, E
80	α -Bisabolene	1540	1730	0.2	RI, MS
84	Germacrene D- 4-ol	1568	2069	t	RI, MS
86	Caryophyllene oxide	1573	2014	0.2	RI, MS, E
92	γ -Muurolol	1636	2178	0.1	RI, MS
	Total (%)			93.0	
	Monoterpènes			19.2	
	Monoterpènes oxygénés			66.4	
	Sesquiterpènes			6.7	
	Sesquiterpènes oxygénés			0.3	
	Autres			0.4	

[1] : Les constituants sont classés dans l'ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ; [2] indice de rétention relatif aux n-alcanes C9-C23 ; [3] : MS : comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; E : comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; IR : comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique à celle que nous avons utilisée; t : trace (<0,1 %).

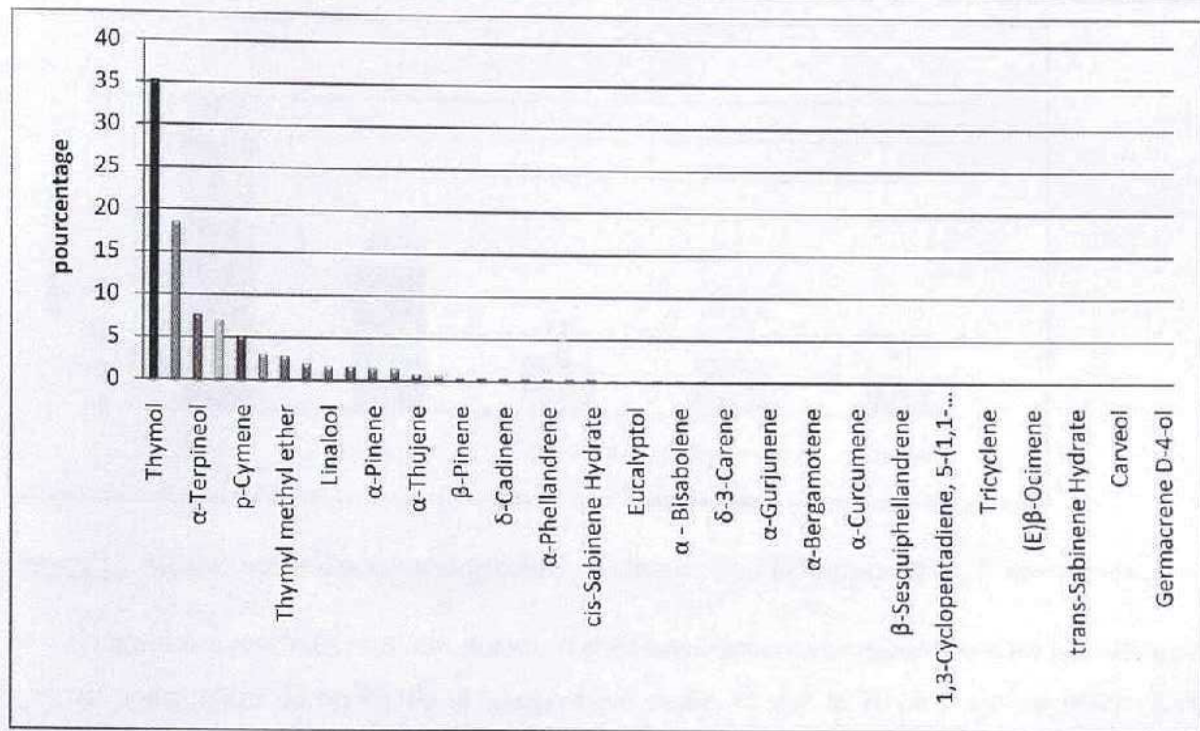


Figure 11 : Histogramme des différents constituants de l'H.E du *T. munbyanus* d'Azazga (T.O)

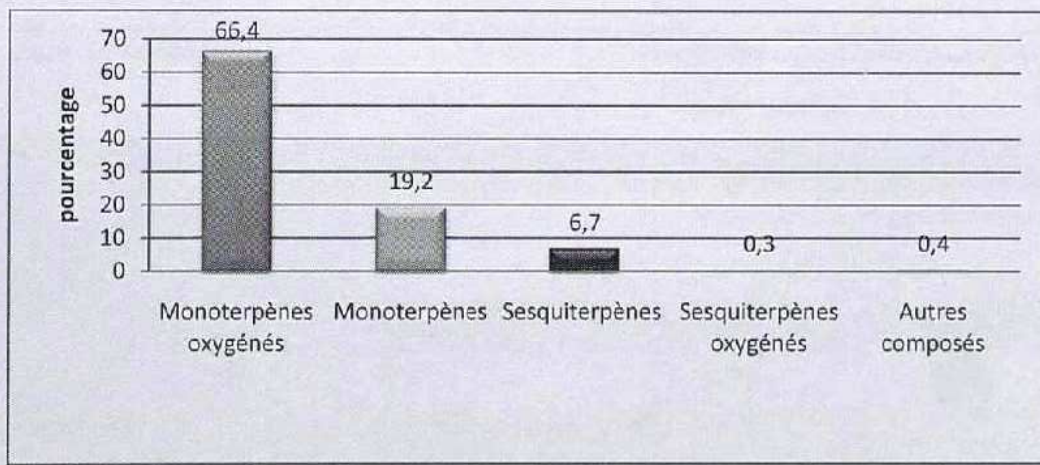


Figure 12 : Histogramme de différentes classes chimiques de l'H.E. de *T. munbyanus*

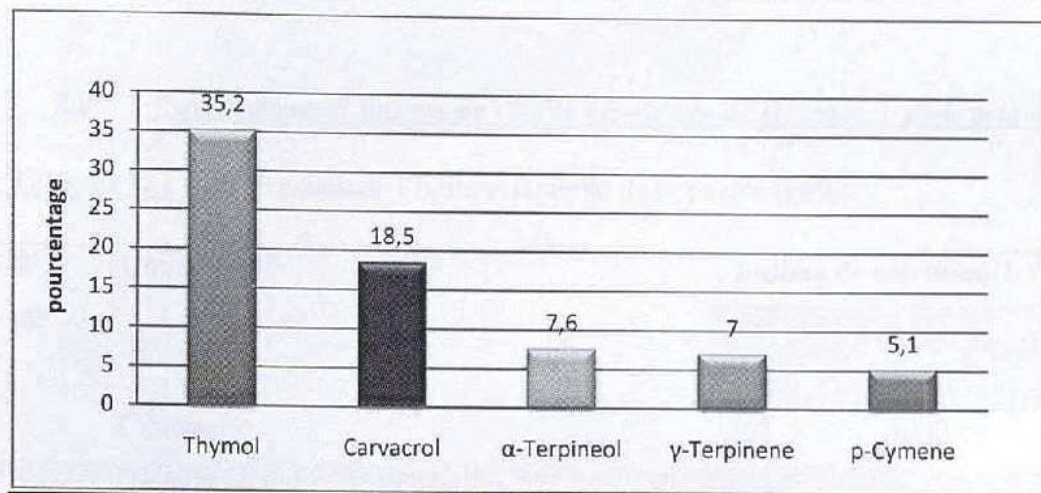


Figure 13: Histogramme des constituants majoritaires de l'huile essentielle de *T. munbyanus*

D'après nos résultats, nous constatons que les monoterpènes oxygénés sont les plus dominants avec un pourcentage de 66.4% de la composition totale, et que le Thymol qui appartient à cette classe (monoterpène oxygéné) représente le composé principal avec une teneur de 35.2% suivi du Carvacrol (18.5%) et de l' α -Terpineol (7.6%).

2. Cas de l'huile essentielle de l'épazote

2.1. Caractéristiques organoleptiques et physiques de l'huile

Les caractéristiques organoleptiques et physiques de l'huile essentielle de *Dysphania ambrosioides* L. sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Caractéristiques organoleptiques et physiques de l'H.E de *Dysphania ambrosioides* L.

Caractéristiques		Huile essentielle de <i>Dysphania ambrosioides</i> L.
Organoleptiques	Aspect	Liquide mobile
	Couleur	Jaune pâle à orangé devenant brunâtre par le vieillissement.
	Odeur	Odeur fortement désagréable
	Goût	Amer
physiques	Indice de réfraction à 20°C (n_D^{20})	1,5320
	Densité relative à 20°C (d_{20}^{20})	0,8890

2.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Dysphania ambrosioides***Tableau 10 :** Composition de l'huile essentielle de l'epazote (en%).

N ^o pic	Composés ⁽¹⁾	Indices de rétention(I _k) ⁽²⁾ (%)		de MS
		HP5MS	PEG	
1	Toluène	762	1042	t
2	2H-pyran,3,4-dihydro-6-méthyl	774	-	t
3	Hexanal	805	1084	t
4	3-penten-1-yne	840	-	t
5	2-hexenal	857	1201	t
6	p-benzoquinone	923	-	t
7	α-pinène	939	1026	t
8	Camphène	948	1072	t
9	1,4-cyclohex-2-enedione	952	1024	0,1
10	Furan,2-pentyl	992	1173	t
11	β-myrcene	992	1173	0,1
12	Δ-3-carene	1009	1163	t
13	α-terpinene	1017	1192	18,3
14	p-cymene	1026	1290	26,4
15	Limonene	1029	1212	0,2
16	γ-terpinene	1061	1261	0,2
17	p-cymenene	1089	1452	0,1
18	nonanal	1108	-	t
19	terpinolene	1087	1300	27,1
20	piperitone oxide	1262	1408	0,3
21	ascaridole	1305	1828	23,3
22	hexyl tiglate	1331	1602	0,1
23	2,3-dimethyl-3-isopropyl-cyclopentene	1340	-	t
24	β-ionone	1488	1920	0,1
total				96,3

[1] : Les constituants sont classés dans l'ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ; [2] indice de rétention relatif aux n-alcanes C9-C23 ; [3] : MS : comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; E : comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; IR : comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique à celle que nous avons utilisée; t : trace (<0,1 %).

L'analyse chromatographique (GC et GC/MS) de l'huile essentielle de l'épazote de la région d'Arbaatache (wilaya de Boumerdes) nous a permis d'identifier 24 composés représentant 96,3% ; dont 4 majoritaires : l' α - terpinene (18,3%), le para-cymene (26,4%), le terpinolène (27,1%) et l'ascaridole (23,3%).

3. Cas des huiles essentielles des feuilles et des tiges de *Ferula vesceritensis* .

3.1. Caractéristiques physiques et organoleptiques des huiles

Les caractéristiques physiques et organoleptiques des huiles essentielles des feuilles et des tiges de *Ferula vesceritensis* sont données dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Caractéristiques organoleptiques et physiques des H.E. des feuilles (stade jeune et stade adulte) et des tiges(stade adulte) de *ferula vesceritensis*

Caractéristiques		HE feuilles (plante adulte)	HE tiges (plantes adultes)	HE feuilles (jeune plante)
Organoleptiques	Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile lipide	Liquide mobile
	Couleur	Jaune clair	Jaune foncé	Jaune verdâtre
	Odeur	épicée	Intence, épicée	
	Goût	Amer	Amer piquant	asturgeon
Physiques	Indice de réfraction à 20°C (n_D^{20})	1.5010	1.5050	1.4480
	Densité relative à 20°C (d_{20}^{20})	0,9330	0,9160	0,910

<i>F. hirtella</i> Boiss.	α -pinene (15.4 %) ; thymol (14.9 %) ; spathulenol (6.5 %) ; citronellol(6.4 %) ; limonene (5.1 %)	Iran ^[5]
<i>F. hermonis</i>	α -pinene (38 %) ; carvacrol (5.5 %)	Liban ^[8]
<i>F. glauca</i> L.	(E)-caryophyllene (20.5 %) ; caryophyllene oxide (13.9 %) ; α -humulene (7.6 %) ; germacreneD (6.8 %)	Italie ^[9]
<i>F. assafoetida</i>	phenol, 2-methyl-5-(1-methyl ethyl) (18.2 %) ; α -bisabolol (10.4 %) ; arsine triethyl (8.7 %)	Iran ^[10]
<i>F. vesseritensis</i>	Vidiriflorol(13.4%); acetate(7.3%) ; aristolene(5.2%)	δ -Cadinene(10.1%) ; farnesol(8.9%) ; fenchyl ^[11] Algérie

[1] : Abedi D. et al., 2008 ; [2] : Bamoniri A. et Mazoochi A., 2009 ; [3] : Ferrari B. et Tomi F., 2005 [4] : Kose E.O. et al., 2010 ; [5] : Reza Akhgar M. et al., 2005 ; [6] : Rustaiyan A., et al., 2005 ; [7] : Habibi Z., et al., 2006 ; [8] : Hilan C., et al., 2007 ; [9] : Maggi F., et al., 2009 ; [10] : Dehpour A. A., et al., 2009 ; [11] Benchabane O. et al 2012.

Tableau 13 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis* Coss. et dur. (plante jeune et plante adulte).

N°	Composés ^[1]	Indices de rétention ^[2]		<i>Ferula vesceritensis</i> Coss.		Identification ^[3]
		HP5M S	Stabilwa x (PEG)	Parties aériennes de jeune plante	Parties aériennes de la plante adulte	
1	Hexanal	800	1083	t	-	RI, MS
2	Tricyclene	923	1017	t	t	RI, MS
3	α -Thujene	925	1029	0.6	t	RI, MS, E
4	α -Pinene	935	1026	5.6	1.5	RI, MS, E
5	Camphene	948	1072	0.2	0.2	RI, MS, E
6	Verbenene	953	1121	t	t	RI, MS
7	Sabinene	972	1132	0.2	-	RI, MS, E
8	β -Pinene	976	1119	1.8	0.3	RI, MS, E
9	1-Octen-3-ol	982	1411	0.1	-	RI, MS

10	6-Methyl-5-hepten-2-one	986	1333	t	-	RI, MS
11	β -Myrcene	992	1173	0.4	t	RI, MS, E
12	δ -4-Carene	1001	1128	-	t	RI, MS
13	α -Phellandrene	1007	1177	t	t	RI, MS, E
14	Isobutyl isovalerate	1013	1175	t	-	RI, MS
15	α -Terpinene	1017	1192	t	t	RI, MS, E
16	p-Cymene	1026	1290	0.1	0.1	RI, MS, E
17	Limonene	1029	1212	2.2	0.3	RI, MS, E
18	1,8-Cineole	1033	1223	0.1	0.1	RI, MS, E
19	Salicylaldehyde	1041	1633	t	0.1	RI, MS
20	(E)- β -Ocimene	1048	1272	0.2	-	RI, MS
21	γ -Terpinene	1061	1261	0.2	t	RI, MS, E
22	cis-Sabinene hydrate	1069	1567	t	-	RI, MS
23	cis-Linalool oxide	1072	1480	-	t	RI, MS
24	Terpinolene	1087	1300	0.1	t	RI, MS, E
25	Fenchone	1094	1010	-	0.1	RI, MS
26	trans-Sabinene hydrate	1099	1482	-	0.1	RI, MS
27	Linalool	1104	1554	0.2	0.1	RI, MS, E
28	Isoamyl isovalerate	1106	1217	0.6	0.2	RI, MS
29	n-Amyl isovalerate	1108	-	0.2	-	RI, MS
30	Pinocarveol	1137	1664	t	t	RI, MS
31	Camphor	1144	1556	t	0.1	RI, MS
32	Borneol	1167	1732	-	t	RI, MS, E
33	4-Terpineol	1177	1613	0.1	0.5	RI, MS, E
34	α -Terpineol	1194	1723	t	0.5	RI, MS, E
35	Myrtenal	1196	1649	-	t	RI, MS, E
36	Fenchyl acetate	1227	1490	5.4	7.3	RI, MS
37	Bornyl acetate	1285	1608	0.3	0.5	RI, MS, E
38	Bicycloelemene	1336	1486	t	-	RI, MS
39	α -Longipinene	1347	2211	-	0.1	RI, MS
40	α -Cubebene	1346	1480	0.1	0.7	RI, MS
41	α -Ylangene	1370	1491	-	t	RI, MS

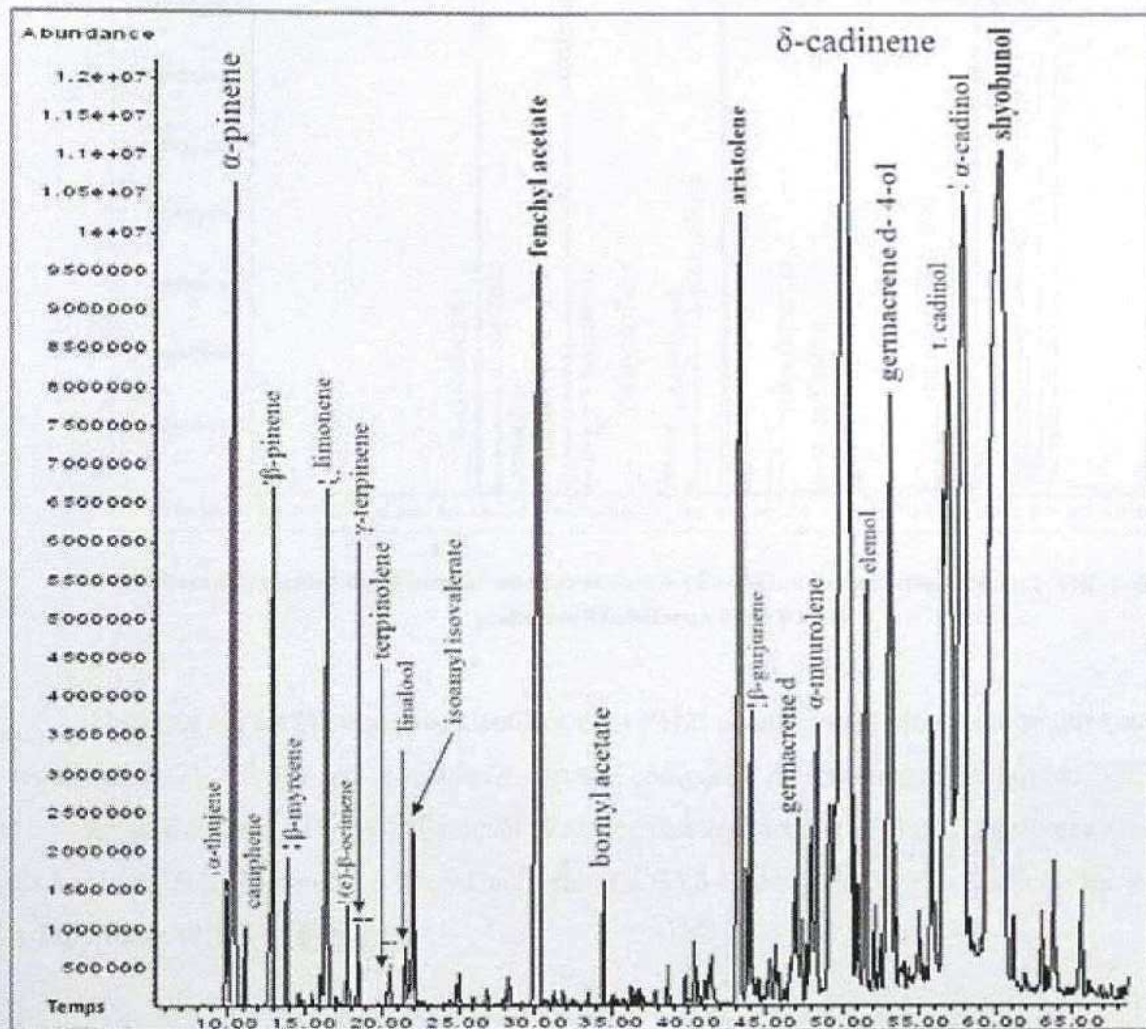
42	α -Copaene	1372	1509	0.2	1.5	RI, MS
43	β -Bourbonene	1380	1536	-	0.1	RI, MS
44	β -Cubebene	1386	1549	0.1	0.2	RI, MS
45	β -Elemene	1391	1591	0.2	-	RI, MS
46	Aristolene	1413	1694	6.2	6.1	RI, MS
47	β -Caryphyllene	1415	1612	-	0.6	RI, MS, E
48	β -Gurjunene	1426	1532	0.9	1.6	RI, MS
49	Aromadendrene	1437	1663	0.1	0.2	RI, MS
50	4,5-Dehydro-isolongifolene*	1430	-	0.1	-	MS
51	α -Humulene	1450	1687	0.2	0.3	RI, MS
52	Geranyl acetone	1451	1848	-	0.2	RI, MS
53	trans- β -Farnesene	1453	1665	0.2	-	RI, MS
54	allo-aromadendrene	1457	1663	-	0.4	RI, MS
55	γ -Muurolene	1472	1690	0.4	-	RI, MS
56	Germacrene D	1477	1726	0.6	0.3	RI, MS, E
57	epi-Bicyclosesquiphellandrene	1485	2046	0.2	1.3	RI, MS
58	β -Selinene	1487	1711	0.3	1.0	RI, MS
59	α -Selinene	1490	1724	-	0.4	RI, MS
60	Valencene	1491	1720	0.7	0.6	RI, MS
61	Bicyclogermacrene	1493	1734	0.1	-	RI, MS
62	α-Muurolene	1495	1740	1.2	2.1	RI, MS
63	γ-Cadinene	1511	1776	1.2	4.6	RI, MS
64	cis-Calamenene	1516	1835	-	1.3	RI, MS, E
65	δ-Cadinene	1518	1772	14.2	10.1	RI, MS
66	Cadina-1,4-diene	1526	1757	0.3	0.5	RI, MS
67	α -Cadinene	1534	1745	0.3	0.8	RI, MS
68	α -Calacorene	1535	1941	-	1.2	RI, MS
69	α -Copaen-11-ol	1537	-	0.4	-	RI, MS
70	Elemol	1549	2081	2.3	0.8	RI, MS
71	Elemicin	1554	2228	0.3	-	RI, MS
72	Nerolidol	1563	2041	0.2	-	RI, MS, E
73	Germacrene D- 4-ol	1568	2069	4.8	1.6	RI, MS

74	Spathulenol	1570	2154	0.5	1.0	RI, MS
75	Caryophyllene oxide	1573	2014	0.4	0.6	RI, MS, E
76	Globulol	1474	2098	-	0.1	RI, MS
77	Fonenol	1590	2138	-	5.2	RI, MS
78	Viridiflorol	1594	2107	0.1	13.4	RI, MS
79	γ -Eudesmol	1618	2177	0.3	-	RI, MS
80	t. Cadinol	1635	2198	8.1	5.5	RI, MS
81	t-Muurolol	1636	2178	-	t	RI, MS
82	β -Eudesmol	1644	2235	0.5	4.3	RI, MS
83	α -Cadinol	1650	2259	9.3	3.8	RI, MS
84	Cadalene	1672	2203	0.4	0.8	RI, MS
85	Shyobunol	1695	-	18.1	-	RI, MS
86	Farnesol	1713	2371	-	8.9	RI, MS
87	Aristolone	1760	2284	+	1.0	RI, MS
88	Myristic acid	1780	2724	-	0.1	RI, MS
89	Hexahydrofarnesyl acetone	1849	2131	-	0.3	RI, MS
90	Pentadecanoic acid	1868	2825	-	t	RI, MS
91	Palmitic acid	1982	2860	t	0.9	RI, MS, E
92	Phytol	2121	2571	0.1	0.1	RI, MS, E
93	Linoleic acid	2148	-	-	t	RI, MS
	Total (%)			92.2	96.8	
	Monoterpènes			11.7	2.4	
	Monoterpènes oxygénés			6.0	9.5	
	Sesquiterpènes			28.8	37.0	
	Sesquiterpènes oxygénés			45.2	47.8	
	Autres			0.5	0.1	

[1] : Les constituants sont classés dans l'ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ; [2] indice de rétention relatif aux n-alcane C9-C23 ; [3] : MS : comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; E : comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; IR : comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique à celle que nous avons utilisée; t : trace (<0,1 %).

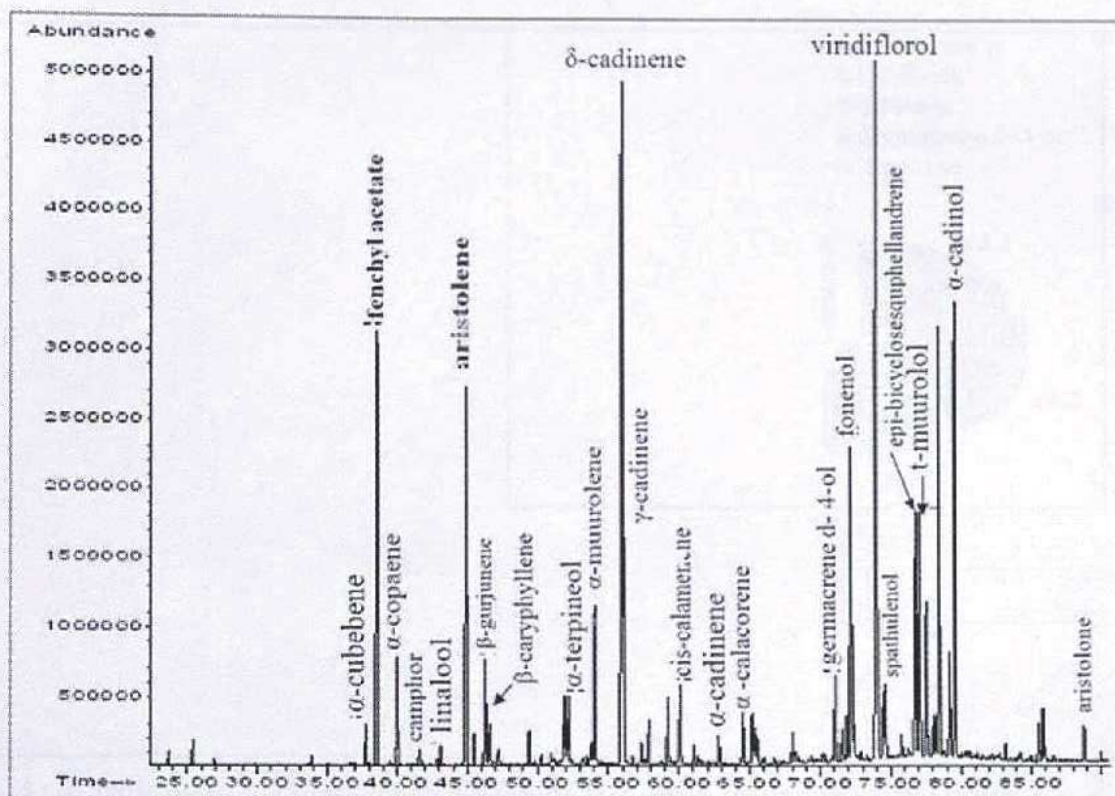
Le profil chromatographique des huiles essentielles de la partie aérienne de *F. vesceritensis* Coss.et dur. nous a permis l'identification de 93 composés, dont :

- ✓ 69 d'entre eux ont été identifiés dans l'H.E. obtenue à partir de la jeune plante, représentant 92.2 % ;
- ✓ 74 composés ont été identifiés dans l'H.E. obtenue à partir de la plante adulte, représentant 96.8 % ;
- ✓ □ 50 composés sont identifiés à la fois dans les deux huiles essentielles



Chromatogramme (GC/MS) de *Ferula vesicariensis* (Parties aériennes de Jeunes plantes) sur colonne non polaire HP5MS

Parmi les 69 composés identifiés dans l'H.E. obtenue à partir de la jeune plante onze composés représentant 78 % peuvent être considérés comme majoritaires, il s'agit du : Shyobunol qui est le prédominant (18.1 %), suivi du δ -Cadinene (14.2 %), α -Cadinol (9.3 %), t.Cadinol (8.1 %), Aristolene (6.2 %), α -Pinene (5.6 %), Fenchyl acetate (5.4 %), Germacrene D-4-ol (4.8 %), Limonene (2.2 %), Elemol (2.3 %), puis du β -Pinene (1.8 %). (figure 14)



Chomatogramme de *Ferula veseritensis* (Feuilles de plante adulte) sur colonne polaire StabilwaxTM(PEG)

Alors que sur les 74 composés identifiés dans l'H.E obtenue de la plante adulte onze composés représentant 71.3 % ont été considérés comme composés majoritaires, il s'agit du Viridiflorol (13.4 %), δ -Cadinene (10.1 %), Farnesol (8.9 %), Fenchyl acetate (7.3 %), Aristolene (6.1 %), t. Cadinol (5.5 %), Fonenol (5.2 %), γ -Cadinene (4.6 %), β -Eudesmol (4.3 %), α -Cadinol (3.8 %), et du α -Muurolene (2.1 %). (figure 15)

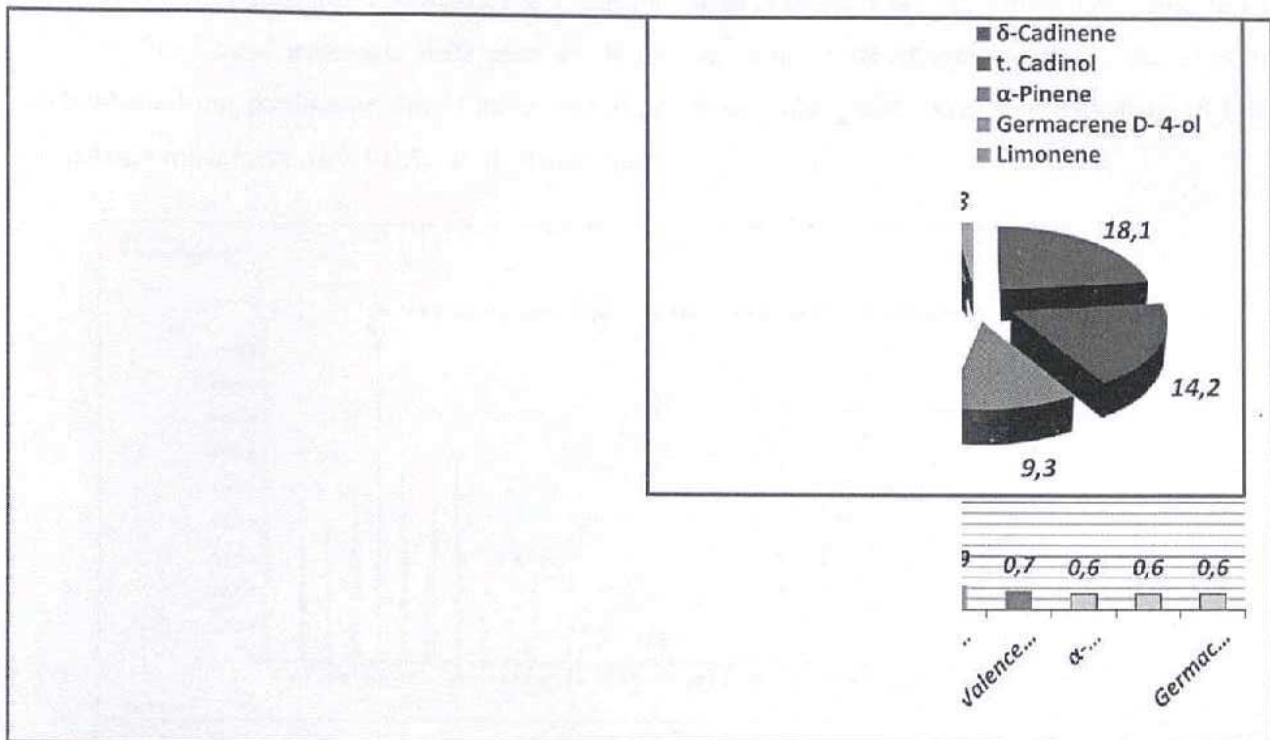


Figure 14 : **A** principaux composés identifiés dans l'H.E. de la jeune plante de *Ferula vesceritensis* Coss., **B** pourcentage des composés majoritaires

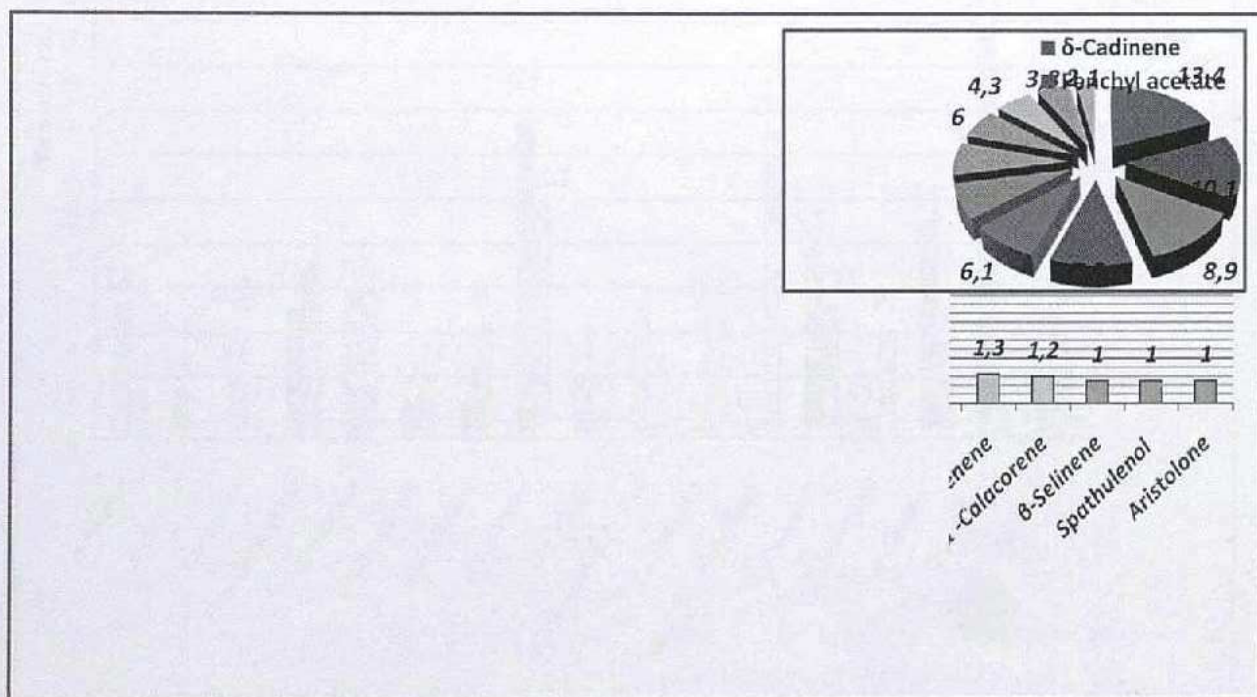


Figure 15: **A** : principaux composés identifiés dans l'H.E. de la plante adulte de *Ferula vesceritensis* Coss., **B** pourcentage des composés majoritaires

D'après la figure 17 on remarque une certaine similitude dans la composition des deux huiles essentielles, mais avec une différence en terme de quantité de chaque composé. En effet le **shyobunol** qui prédomine dans l'huile essentielle de la jeune plante, avec une teneur de 18.1 %, disparaît totalement dans l'H.E. de la plante adulte.

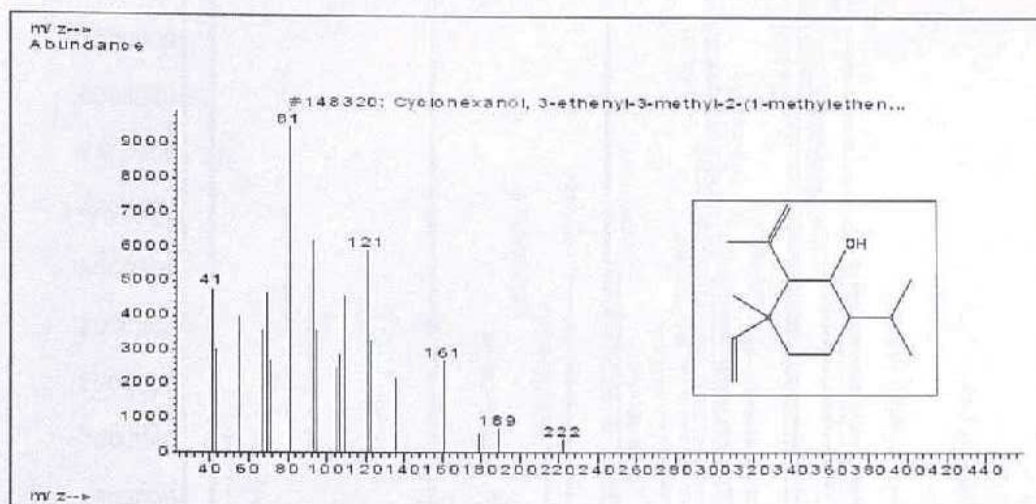


Figure 16 : Structure et spectre de masse du shyobunol

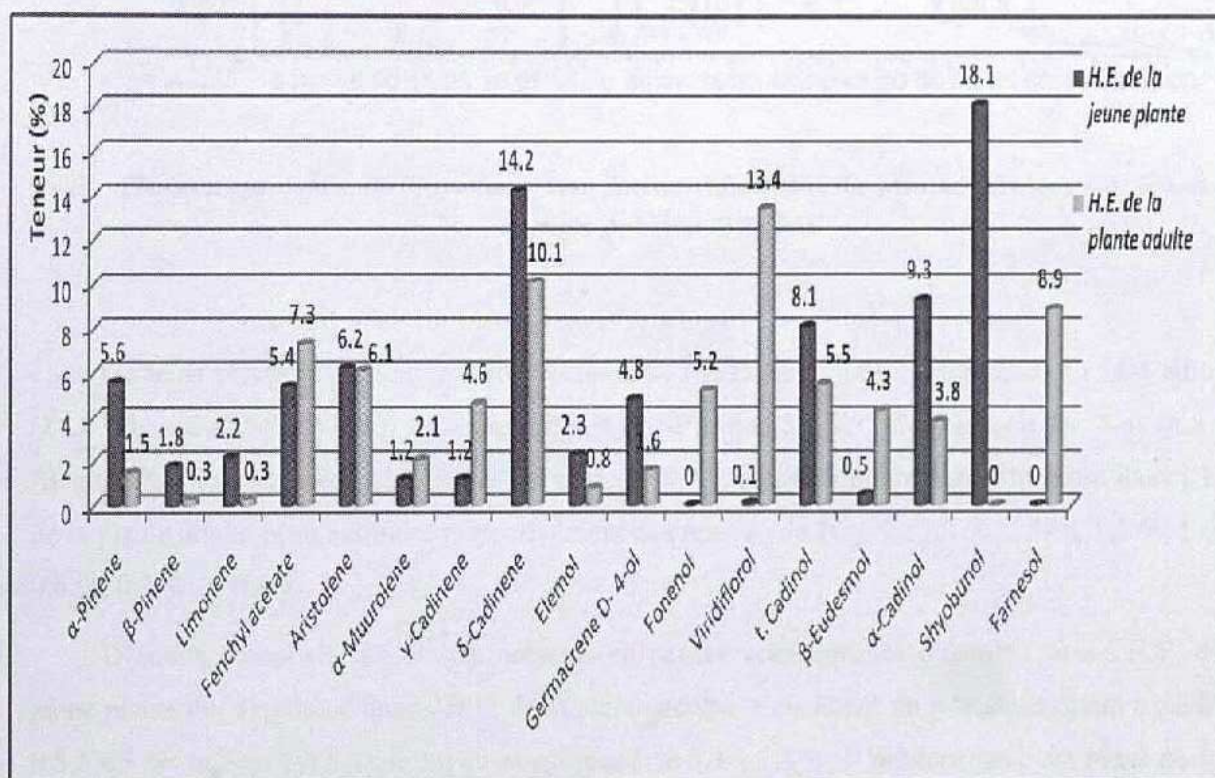
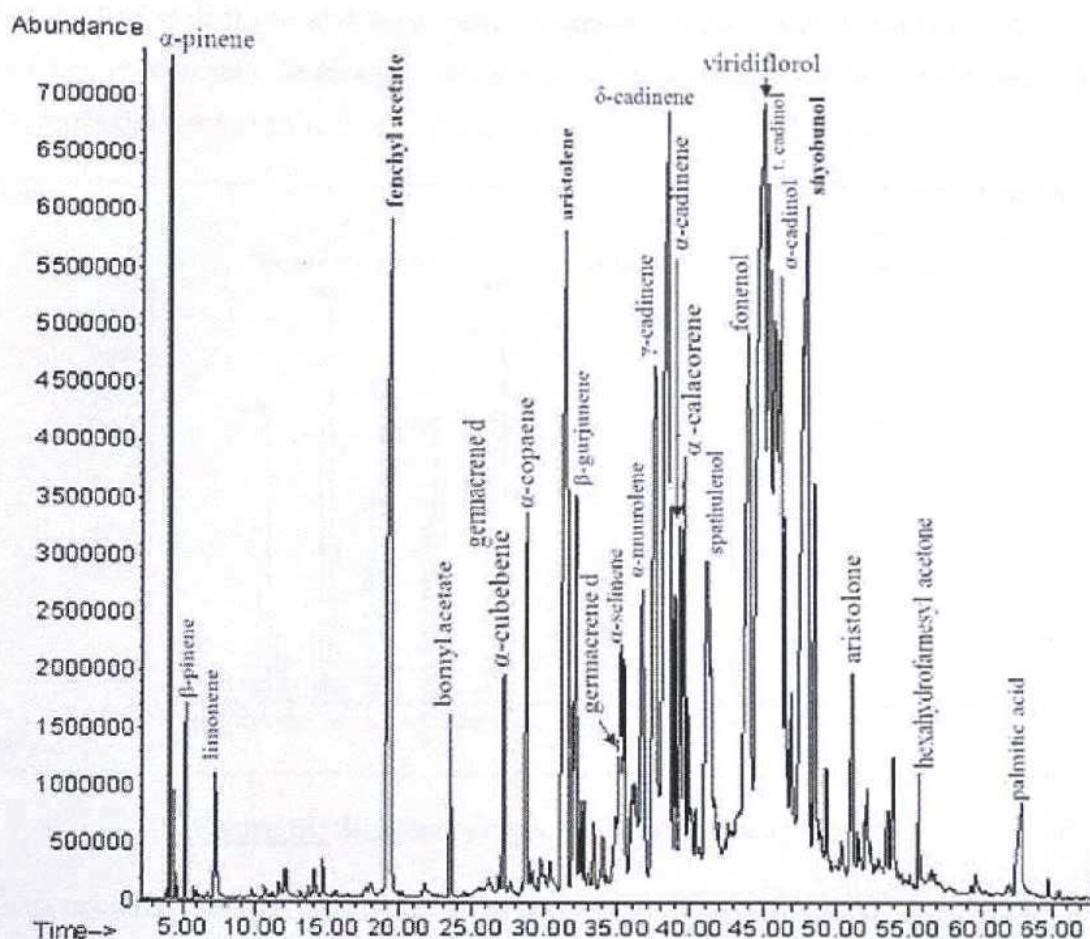


Figure 17 : Comparaison de la composition chimique des H.E. de *Ferula vesceritensis* Coss. au stade jeune et adulte



Chromatogramme de *Ferula vesceritensis* (Feuilles de plante adulte) sur colonne non polaire HP5MS

Certains composés qui étaient abondants dans l'H.E. de la jeune plante à savoir : δ -Cadinene (14.2 %), α -Cadinol (9.3 %), t.Cadinol (8.1 %), α -Pinene (5.6 %), Germacrene D- 4-ol (4.8 %), Elemol (2.3 %), Limonene (2.2 %), et β -Pinene (1.8 %), ont diminué remarquablement dans l'H.E. de la plante adulte pour atteindre respectivement des teneurs de 10.1 %, 3.8 %, 5.5 %, 1.5 %, 1.6 %, 0.8 %, 0.3 %, et 0.3 %.

D'autres composés qui étaient présents en petites voire infimes quantités dans l'H.E. de la jeune plante ont augmenté dans l'H.E. de la plante adulte, c'est le cas du β -Eudesmol qui a passé de 0.5 à 4.3 %, le Fenchyl acetate lui aussi est passé de 5.4 à 7.3 %, l' α -Muurolene est passé de 1.2 à 2.1 %, et le γ -Cadinene qui est passé de 1.2 à 4.6 %.

Par ailleurs, il y a apparition de nouveaux composés majoritaires dans l'H.E. de la plante adulte, qui étaient sous forme de traces ou totalement absents dans l'H.E. de la jeune plante : le

viridiflorol est passé de 0.1 à 13.4 % pour être le composé prédominant (dans l'H.E. obtenue de la plante adulte), le farnesol et le fonenol absents dans l'H.E. de la jeune plante (0 %) donnent 8.9 % et 5.2 %, respectivement dans l'H.E. de la plante adulte.

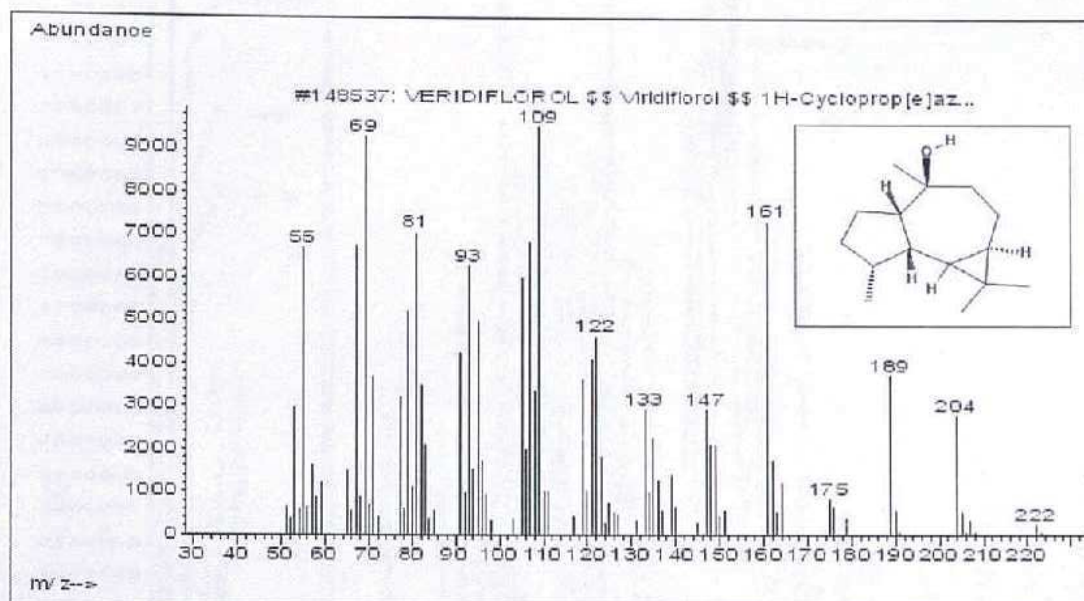
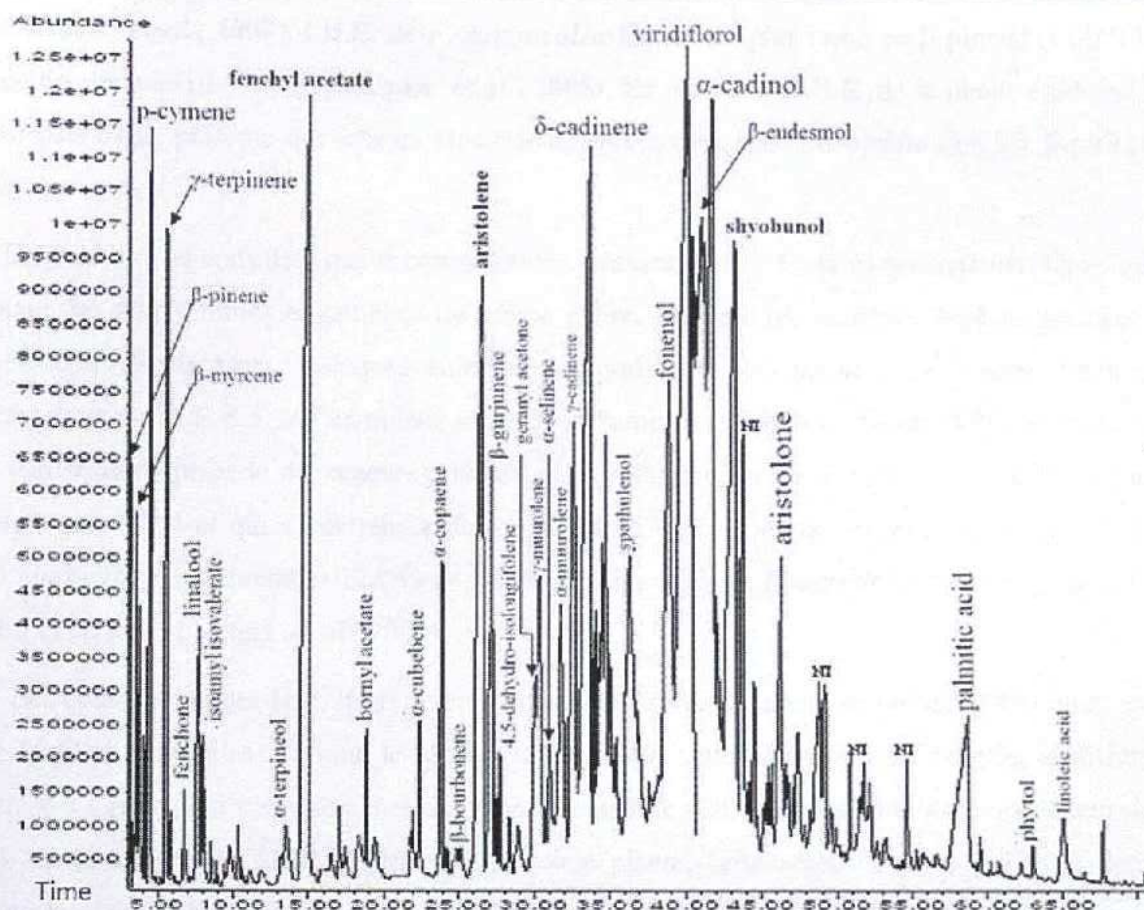


Figure 18: Structure et spectre de masse du viridiflorol

Étant donné, d'une part, la disparition du Shyobunol, le composé prédominant (18.1 %), du stade jeune au stade adulte de la plante, et la diminution de la teneur de quelques composés précités, et d'autre part l'apparition et la dominance de nouveaux composés dans l'H.E. de la plante adulte, le cas du viridiflorol, farnesol, et du fonenol. On suppose pour cela que la biosynthèse de ces derniers n'aura lieu qu'après l'hiver (après décembre) à partir des composés qui disparaissent ou diminuent en pourcentage (Shyobunol, δ -Cadinene, α -Pinene, β -Pinene, Limonene, α -Cadinol, et Germacrene D-4-ol). Toutefois cette hypothèse reste à confirmer par des modèles de réactions de bioconversions qui répondent bien à cet effet.



Le seul composé qui a plus ou moins gardé la même teneur dans les deux stades est l'aristolène, qui a pratiquement stagné autour de 6,1 % (6.1 % dans l'H.E. de la jeune plante et 6.2 % dans l'H.E. de la plante adulte).

D'après les études faites sur la composition chimique des H.E. du genre *Ferula*, il semble que c'est pour la première fois que le viridiflorol est identifié comme composé majoritaire dans la plante étudiée avec une teneur de 13.4 %, de même pour le shyobunol 18.1 % (au stade jeune), ce qui suggère un **nouveau chémotype** pour l'H.E de notre espèce.

On constate que les H.E. de ce genre possèdent une large gamme de composés et marquent une diversité notable. Cependant beaucoup d'entre elles ont des points communs, comme leur richesse en quelques monoterpènes, notamment l' α -pinène, le β -Pinene, et le limonène, en effet, l'H.E. de *F. lycia* Boiss. contient 59.89 % d' α -pinène, 19.01 % de β -pinène et 3.21 % de limonène (Kose E.O. et al., 2010), l'H.E. de *F. microcolea* Boiss. contient 19.2 % d' α -pinène, 13 % de β -pinène et 5.4 % de limonène (Reza Akhgar M. et al., 2005), *F. hermonis* contient 38 % d' α -

pinène (Hilan et al., 2007), l'H.E. de *F. macrocolea* Boiss. est plus riche en β -pinène (15.9 %), suivi de l' α -pinène (10.4 %) (Rustaiyan et al., 2005). En revanche l' H.E. de la plante étudiée *F. vesceritensis* Coss. présente des teneurs plus faibles en ces composés : α -pinène (5.6 %), β -pinène (1.8 %), limonène (2.2 %)

En générale, on considère que la composition chimique de l'H. E. de *F. vesceritensis* Coss. est différente des autres huiles essentielles du même genre. Néanmoins, certaines espèces partagent avec *F. vesceritensis* Coss. quelques composés majoritaires : *F.communis* de Corse (France) renferme dans son H.E. 8.5 % d'aristolène et 4.3 % de farnésol (Ferrari et Tomi, 2005) au moment où *F. vesceritensis* possède des teneurs proches en ces composés : 8.9 % et 6.1 % respectivement. Le germacrène D- 4-ol qui a une teneur de 4.8 % dans l'H.E. de *F. vesceritensis* Coss. (au stade jeune) représente respectivement 12.5 % et 6.8 % dans les H.E. de *F. azowitsiana* et *F. glauca* L. (Habibi et al, 2006 ; Maggi et al, 2009)

Les constituants des H.E. de *F.vesceritensis* Coss. se répartissent, selon leurs structures, en quatre familles chimiques. Comme le montre la figure 19, cette répartition est inégale, et diffère d'un stade à l'autre. Les sesquiterpènes oxygénés tiennent la part prépondérante avec une teneur de 45.2 % de la totalité de l'H.E. obtenue de la jeune plante, cette teneur s'élève à 47.8 % dans l'H.E.de la plante adulte. Les sesquiterpènes viennent en deuxième position avec une teneur de 28.8 % de l'H.E. de la jeune plante, qui s'accroît sensiblement pour atteindre 37 % de l'H.E. au stade adulte. Les monoterpènes, eux représentent 11.7 % de l'H.E au stade jeune, mais leur proportion décroît de façon remarquable jusqu'à 2.4 % au stade adulte de la plante, cette diminution pourra être le résultat d'une éventuelle bioconversion (ou condensation) des monoterpènes au cours du développement du végétal, en monoterpènes oxygénés sesquiterpènes ou en ceux qui connaissent une augmentation comme nous l'avons précisé plus haut, mais l'augmentation de la température ambiante dès le printemps peut être responsable d'une volatilisation des monoterpènes.

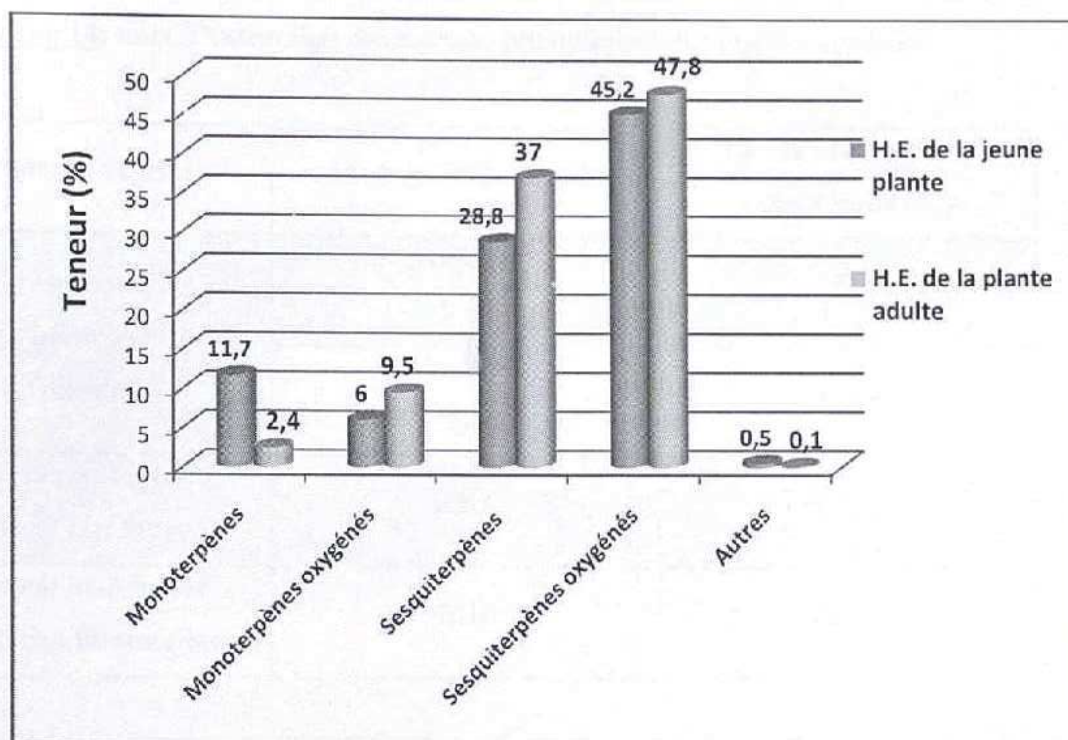


Figure 19 : Principales familles chimiques dans les H.E. de *F. vesceritensis* Coss.

Quant aux monoterpènes oxygénés, ils sont de faible teneur relativement aux autres espèces chimiques : ils passent de 6 % au stade jeune à 9.5 % au stade adulte.

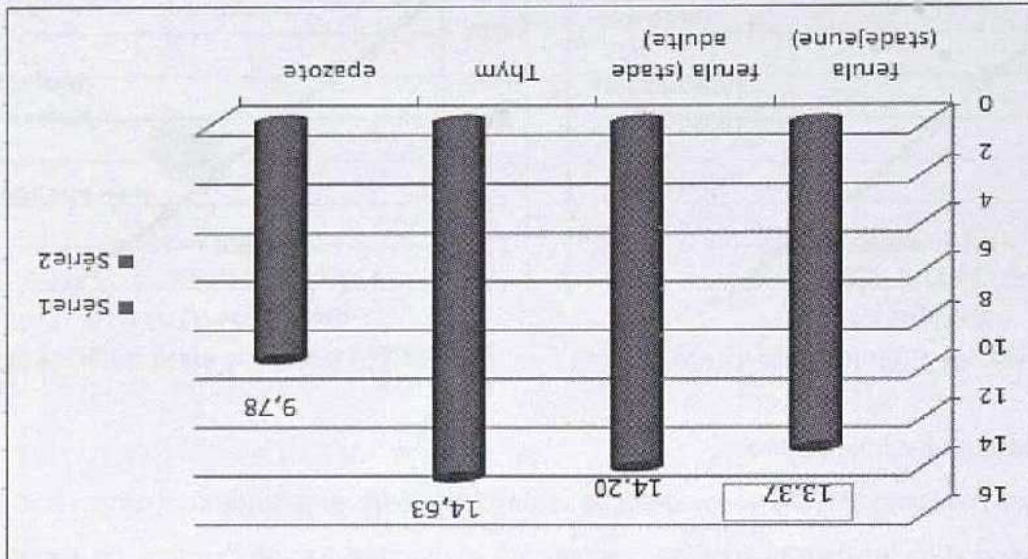
Sahebkar A. et Sahebkar M. (2010) qui ont fait une synthèse générale sur l'activité biologique de plusieurs espèces du genre *Ferula*, ont proposé une classification de ces espèces selon la composition chimique, dont le premier critère est la teneur en composés sulfurés, le deuxième critère est la teneur en monoterpènes, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes, et sesquiterpènes oxygénés. En se référant à cette classification, et comme l'H.E. de la plante étudiée ne contient pas de composés sulfurés, on la classe comme une H.E. de composition non sulfurée avec prédominance des sesquiterpènes (oxygénés et non oxygénés)

II : Extraits éthanoliques :

1. Taux d'extraction

Les rendements des extraits éthanoliques obtenus par Soxhlet sont résumés dans le Tableau suivant :

Figure 20 : Taux d'extraction des extraits éthanoliques des trois plantes



montre la figure suivante :

Toutefois, la différence entre les deux extraits n'est pas importante (environ 0,8 %) comme le

que la biosynthèse de ces composés ne s'achève qu'à la maturité de la plante.

phénoliques (14,2 %) qu'au stade jeune (13,37 %), ceci peut s'expliquer éventuellement par le fait

On constate que la plante au stade de floraison est relativement plus riche en composés

Matériel végétal	Moment de la récolte	Le taux de l'extrait éthanolique (%)
Partie aérienne desséchée Ferula vesicertensis Coss. (Ghardaia)	Décembre 2012 (Stade jeune)	13,37
	Mai 2010 (Stade Floraison)	14,20
<i>Thymus munbyanus</i> Azazga(Tizi-Ouzou)	2010	14,63
<i>Dysphania ambrosioides</i> Arbatache(Boumerdes)	2010	9,78

Tableau 14: taux d'extraction des extraits phénoliques des plantes étudiées

Ces deux pourcentages sont légèrement faibles que celui de l'extrait de *thymus munbyanus* (14,63%), mais plus important que pour l'extrait de *Chenopodium ambrosioides* (9,78%).

Si l'on compare nos résultats à ceux trouvés sur des espèces du même genre *Ferula*, comme le rendement en extrait éthanolique de *F. oopoda* de 4.1 % (Anonyme), celui de l'extrait méthanolique de *F. assafoetida* de 10.8 % (Dehpour et al, 2009), celui de l'extrait hexanique de *F. Communis* de 2,51 % (Mamoci et al, 2011), et avec celui de l'extrait méthanolique de *F. orientalis* de 9.5 % (Kartal et al., 2005), alors on constate que nos rendements d'extraction des composés phénoliques à partir de *F. vesceriteneis* (13.7 % et 14.2 %) sont les plus élevés.

Cette différence notable pourra être due à plusieurs facteurs dont le plus déterminant est l'espèce botanique et la notion de chémotype, mais aussi l'influence des facteurs extrinsèques tel que les conditions édapho-climatiques (altitude, température, pluviométrie, intensité lumineuse, durée d'ensoleillement, richesse du sol en éléments nutritifs..). Le stade végétatif et les organes de la plante récoltée ont aussi leur part dans l'affectation du rendement en composés issus du métabolisme secondaire.

2. Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits éthanoliques :

Le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes a été réalisé sur les extraits éthanoliques obtenus en deux stades végétatifs de la plante étudiée, stade jeune (E₁) (décembre) et stade adulte (E₂) (floraison au mois de mai).

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu pour l'estimation des phénols totaux, en utilisant la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique. De même pour le dosage des flavonoïdes, nous avons procédé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃), avec la quercitine comme standard.

Figure 21: courbe d'étalonnage de l'acide gallique (AG.)

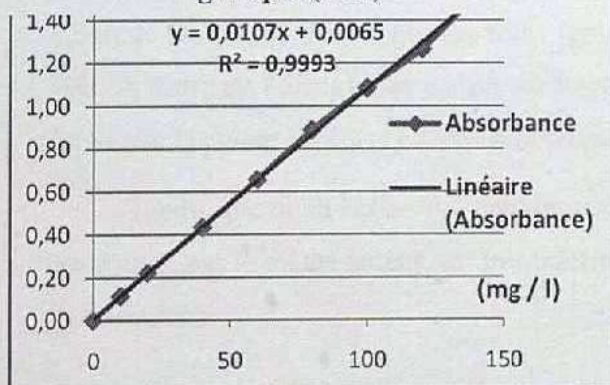
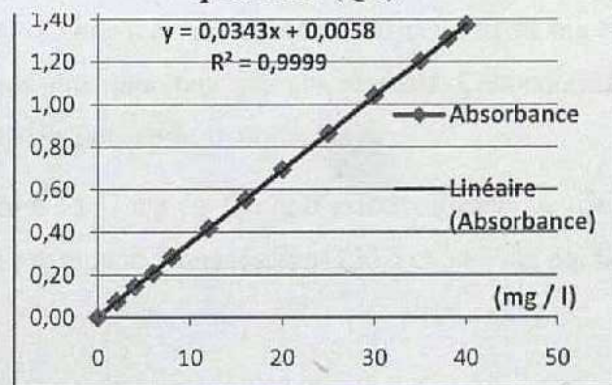


Figure 22 : courbe d'étalonnage de la quercitine (Qr.)



Les courbes d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercitine (Figure 21 et 22) ont la forme de droites ayant une équation de type $y = a x + b$.

Nos résultats sont illustrés dans la figure

ci-contre, et sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique/g d'extrait, pour les

phénols totaux, et en mg équivalents de quercitine/g d'extrait, pour les flavonoïdes.

On note une différence quantitative très claire de la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes entre les deux extraits éthanoliques

de la plante étudiée. Au stade jeune (E_1) les phénols totaux dosent 20.5 mg éq. AG. /g d'extrait, alors qu'au stade floraison

(E_2) cette quantité sera plus que doublée

: 45.7 mg éq. AG. /g d'extrait.

La même chose est notée pour les flavonoïdes qui passent de 19 à 34.3 mg éq. Qr. /g d'extrait.

Cette augmentation de la quantité des phénols totaux et des flavonoïdes est normale, et s'explique par le fait que le végétal synthétise et accumule ces substances faisant partie du métabolisme secondaire au fur et à mesure de son développement. Un important pouvoir antioxydant, antimicrobien et insecticide de l'extrait E_2 (plante adulte) est probablement attribué à cette richesse en phénols totaux et en flavonoïdes, comparativement à l'extrait E_1 (jeune plante).

Les travaux de **Bouchouka et al. (2012)** sur la même plante étudiée (*Ferula vesceritensis* Coss. de Ghardaïa) montre que les fruits (graines) ont une teneur en phénols totaux de 61.91 mg éq. AG. /g d'extrait éthanolique, ce qui est largement plus important que nos résultats. Cela confirme aussi que la plante continue encore la synthèse des phénols après la floraison.

Tandis que la teneur en flavonoïdes estimée à 10.57 mg éq. Qr. /g d'extrait éthanolique (dans les fruits), par le même auteur, est très inférieure par rapport à nos résultats (20.5 et 34.3 mg éq. Qr. /g d'extrait.).

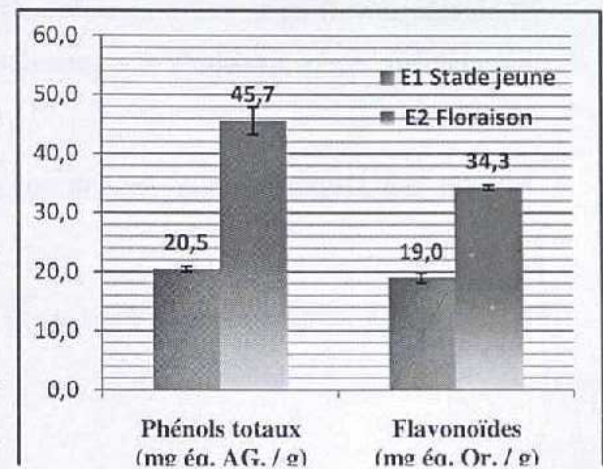


Figure 23 : Phénols totaux et flavonoïdes des extraits de ferula aux stades jeune et adultes

L'espèce *Ferula assafoetida* (partie aérienne) a révélé des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes de 94.8 mg éq. AG. /g et 90.9 mg éq. Qr. /g d'extrait méthanolique, respectivement (Dehpour et al, 2009), ces teneurs dépassent largement nos résultats

De manière générale on ne considère que la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de la plante *F. veseritensis* Coss. est relativement faible relativement à d'autres espèces médicinales (Bouchouka et al, 2012).

3. Évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits des plantes étudiées :

Afin de mesurer l'activité antioxydante des H.E et des extraits des trois plantes étudiées, nous avons effectué trois tests de références :

- Test de piégeage du radical DPPH ;
- Mesure du pouvoir réducteur ;
- Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS).

3.1. Activité de piégeage du radical DPPH :

Nous avons déterminé l'activité de piégeage du radical DPPH pour les deux huiles essentielles et les deux extraits obtenus en deux stades végétatifs (stade jeune et adulte) pour *F.verescitensis*, sur l'H.E et l'extrait des feuilles pour *Thymus munbyanus* et sur l'H.E et l'extrait de la partie aérienne de *Dysphania ambrosioides* L.. Les résultats sont comparés avec ceux de l'antioxydant synthétique BHT.

3.1.1. Cas des huiles essentielles :

Nos résultats concernant le test des H.E. (jeune plante et plante adulte) de la ferule (*Ferula .verescitensis*) ,de l'H.E.du thym (*Thymus munbyanus*) ,de l'H.E.de l'épazote(*Dysphania ambrosioides*) et du BHT à l'égard du radical DPPH sont donnés par le tableau 15

Tableau 15 : Activité de piégeage (scavenging) du radical DPPH des huiles essentielles et du BHT

Concentration (mg/l)	Piégeage du radical DPPH (%)*				
	H.E. de <i>Ferula vesceritensis</i>		H.E. de <i>Thymus munbyanus</i>	H.E. de <i>Dysphania ambrosioides</i> L.	BHT
	Jeune plante	Plante adulte			
100	5.93 ± 0.25	9.95 ± 0.23	27,78 ± 0,77	21.19±4.11	73.15 ± 0.85
200	6.21 ± 0.07	12.17 ± 0.07	36,82 ± 0,64	33.88±.83	80.63 ± 0.32
400	5.99 ± 0.21	15.33 ± 0.19	56,32 ± 0,68	36.05±1.13	84.75 ± 0.52
600	6.78 ± 0.24	16.10 ± 0.03	56,32 ± 0,68	9.06±1.36	86.35 ± 0.59
800	7.02 ± 0.13	16.09 ± 0.04	56,32 ± 0,68	-4.17±1.56	88.81 ± 0.27
1000	6.77 ± 0.18	25.01 ± 0.32	92,53 ± 0,5	-18.66±1.57	91.07 ± 0.13

* : Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de trois répétitions ± l'écart-type

Le tableau 15 montre la très faible activité antiradicalaire de l'H.E. de *Ferula vesceritensis* Coss. obtenue au stade jeune vis-à-vis du radical DPPH, et ce quelque soit sa concentration, en effet les valeurs obtenues s'axent autour de 6 %, au moment où le BHT présente dès la plus faible concentration (100 mg/l) une activité considérable d'environ 73 %, cette valeur s'améliore encore plus, jusqu'à arriver à piéger 91 % des radicaux libres DPPH à la concentration de 1000mg/l, alors que l'H.E. de *Thymus munbyanus* piège environ 28% à la plus faible concentration (100mg/l) pour atteindre une activité de piégeage de 92,53% à la concentration de 1000mg/l.

L'huile essentielle extraite de la plante de *Ferula vesceritensis* Coss. au stade floraison possède quand- même une certaine activité de piégeage des radicaux libres nettement plus élevée qu'au stade jeune. À la faible concentration 100 mg/l on enregistre une activité moyenne de 9.95 %, qui s'améliore de plus en plus qu'on augmente la dose de l'H.E. jusqu'à arriver à 25 % à la dose 1000 mg/l.

Par contre l'H.E. de l'épazote (*Dysphania ambrosioides* L.), son activité antiradicalaire passe de 21,19% à la concentration de 100mg/l à 36,05% pour la concentration de 400mg/l pour rechuter brusquement au delà de cette concentration.

Par conséquent, les huiles essentielles sont très loin d'inhiber 50 % des radicaux libres, alors que l'IC₅₀ de *Thymus munbyanus* est atteint à la concentration de 400mg/l celui de la BHT est obtenue avant même la plus faible concentration utilisée (100 mg/l), ce qui reflète son très bon

pouvoir antioxydant. Par ailleurs, dans le genre *Ferula*, on retrouve l'huile essentielle de l'espèce *F. orientalis* qui selon **Sahebkar A. et Iranshahi M. (2010)** possède un bon pouvoir antioxydant au même titre que la β -carotène et l'acide linoléique, sans préciser des pourcentages. Cependant, selon la même source, cette H.E. n'est pas aussi forte que le test positif (BHT)

Les résultats trouvés par **Kose, et al. (2010)** sur l'huile essentielle de la partie aérienne de *Ferula lycia* Boss. Ont révélés un pourcentage de piégeage du radical DPPH de $1.91 \pm 0.43 \%$ et $2.81 \pm 0.00 \%$ pour les concentrations 1000 mg/l et 2000 mg/l, respectivement. Ces valeurs restent encore très minimales comparativement à nos résultats.

3.1.2. Cas des extraits éthanologiques :

Nos résultats concernant le test des extraits éthanologiques E₁ et E₂ de *Ferula vesceritensis*, de celui de *Thymus munbyanus*, de celui de l'épazote (*Dysphania ambrosioides* L.), et du BHT vis à vis du piégeage du radical DPPH sont donnés par le tableau 16.

Tableau 16 Activité de piégeage du radical DPPH du BHT et des extraits éthanologiques

Concentration (mg/l)	Piégeage du radical DPPH (%)*				
	Extraits de <i>Ferula vesceritensis</i>		Extrait de <i>Thymus munbyanus</i>	Extrait de l'épazote	BHT
	E1 (Jeune Plante)	E2 (Plante adulte)			
2	3.45 ± 0.53	5.88 ± 2.54	N.D.	-0.83±0.09	ND
5	5.29 ± 0.22	5.83 ± 0.29	27.74 ± 0.22	2.08±0.12	ND
10	8.70 ± 1.10	6.42 ± 0.26	38.26 ± 0.69	3.47±0.17	31.40 ± 0.70
20	10.23 ± 0.41	9.51 ± 0.71	59.80 ± 0.41	4.15±0.19	42.14 ± 0.48
50	19.37 ± 0.57	15.29 ± 0.64	85.72 ± 0.33	31.06±0.23	62.49 ± 0.69
100	23.39 ± 0.59	34.84 ± 0.59	92.03 ± 0.34	46.89±0.28	73.15 ± 0.85
200	34.86 ± 1.36	53.40 ± 1.57	N.D.	70.76±0.87	80.63 ± 0.32
400	50.84 ± 0.58	69.62 ± 0.34	N.D.	N.D.	84.75 ± 0.52
600	56.41 ± 0.58	77.70 ± 1.59	N.D.	N.D.	86.35 ± 0.59
800	59.81 ± 0.87	78.30 ± 0.14	N.D.	N.D.	88.81 ± 0.27
1000	65.55 ± 0.88	77.44 ± 0.19	N.D.	N.D.	91.07 ± 0.13

* : Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de trois répétitions \pm l'écart-type

ND : valeur non déterminée

Contrairement à l'H.E., les extraits phénoliques (E₁ et E₂) manifestent une activité antioxydante notable par le test à la DPPH, qui atteint le seuil de 77.44 ± 0.19 %, pour l'extrait de la plante adulte à la concentration de 1000mg/l, alors que celui du thym est beaucoup plus important avec un seuil de 92.03 ± 0.34 à la concentration de 100mg/l, celui de l'épazote il atteint le seuil de 70,76% pour la concentration de 200mg/l. tableau 15.

À de très faibles concentrations (2 et 5 mg/l), l'activité moyenne de piégeage du radical DPPH par les extraits est faible : 3.45 et 5.88 à 2 mg/l, 5.29 et 5.83 % à mg/l, pour E1 et E2 respectivement. Mais au fur et à mesure que la concentration s'élève, on note une augmentation proportionnelle de leurs activités. alors que pour l'extrait de thym l'activité de piégeage à 5mg/l est de 27.74 ± 0.22 . Quant à l'antioxydant synthétique de référence BHT, il donne la preuve de son excellent pouvoir antioxydant, puisqu'à une dose de 10 mg/l il est déjà capable de piéger en moyenne 31.40 % des radicaux libres. Ce pourcentage évolue positivement jusqu'à atteindre, à la concentration de 1000 mg/l, un seuil de 91.07 % en moyenne. En outre, on note qu'à chaque concentration le BHT représente la substance qui possède la plus forte activité antiradicalaire, suivi de l'extrait E2, puis de l'extrait E1.

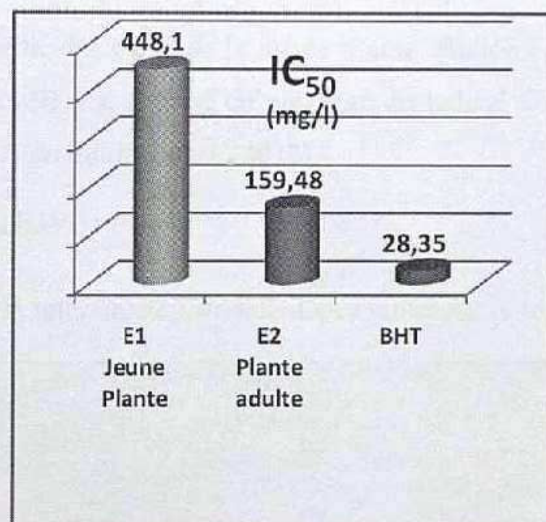


Figure 24 : IC₅₀ des extraits de *Ferula vesceritensis* Coss. et du BHT

La figure 24 illustre les IC₅₀ des trois substances, déterminées à partir de la régression de la courbe de l'évolution de l'activité en fonction de la concentration. Plus la valeur IC₅₀ d'une substance est faible, plus son activité antioxydante est forte.

La détermination des IC₅₀ confirme l'ensemble de nos constatations concernant l'activité de piégeage (scavenging) des radicaux par les différentes substances testées.

D'après la figure 24, l'inhibition de la moitié des radicaux est obtenue par le BHT (standard) à une dose faible : 28.35 mg/l, cela explique un peu sa vaste utilisation en industrie agroalimentaire. Ce même taux est obtenu par l'extrait E₂ à une dose de 159.48 mg/l, alors que l'extrait de la plante jeune E₁ n'assure cette inhibition qu'à la dose de 148.1 mg/l, alors que celui de l'extrait de l'epazote est de 103.67mg/l.

Ordre décroissant de l'activité du piégeage du radical DPPH

La riche **BHT > E₂ (plante jeune) > Extrait epazote > E₁ (plante adulte)** entre les deux

extraits, en effet comme l'on a vu, l'extrait E₂ obtenu à partir de la partie aérienne de la plante au stade floraisons est plus riche en ces substances actives que l'extrait E₁ obtenu au stade jeune. La capacité des flavonoïdes ainsi que des phénols totaux à piéger les radicaux libres s'explique par leurs structures chimiques comportant un nombre important d'atomes d'hydrogène, des groupements hydroxylés, des noyaux phénylés qui seraient capables de capter les radicaux libres en démobilisant leurs électrons célibataires (Calliste et al., 2001, Torres de Pinedo et al., 2007 ; Wojdyło et al., 2007).

L'extrait obtenu à partir des fruits de la même plante étudiée *Ferula vesceritensis* Coss. (la fraction éthyle acétate) a révélé une activité de piégeage du radical DPPH de 19.2 mg équivalents de vitamine C/g d'extrait. (Bouchouka et al., 2012)

Analyse de la variance (ANOVA) :

Tableau 17 : Tests des effets inter-sujets Variable dépendante: Activité de piégeage du radical DPPH

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Modèle corrigé	1184.401	11	107.673	3043.260	.000
Constante	4446.538	1	4446.538	125676.797	.000
A	783.199	1	783.199	22136.320	.000
B	222.493	5	44.499	1257.704	.000
A * B	178.709	5	35.742	1010.204	.000
Erreur	.849	24		3.538E-02	
Total		5631.788		36	
Total corrigé		1185.250		35	

a R deux = .996 (R deux ajusté = .994)

D'après les résultats obtenus (Tableau 24) la valeur de signification du facteur A est supérieure à 0.05 alors que les autres significations sont nulles, par conséquent, l'hypothèse est acceptée, et les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{A*B} sont rejetées :

Le facteur A n'influe pas : le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle n'a pas d'effet sur le pouvoir réducteur.

Le facteur B influe : la concentration de l'huile essentielle a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

Le facteur A*B influe : il y a une interaction entre le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle et la concentration de celle-ci, qui a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

3.2. Évaluation du pouvoir réducteur :

Le pouvoir réducteur mesure la capacité de 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 les espèces chimiques réactives en tant que donneur d'électrons tels que les radicaux libres. Ces radicaux ainsi réduits deviennent plus stables.

3.2.1. Cas des huiles essentielles :

Le tableau 16 regroupe l'ensemble des résultats du pouvoir réducteur des deux huiles essentielles de la plante étudiée, correspondant aux deux stades végétatifs, ainsi que celui de l'antioxydant synthétique BHT.

Tableau 18 : Pouvoir réducteur des H.E. testées et du BHT

Concentration (mg/l)	Absorbance à 700 nm *				
	huiles essentielles de <i>Ferula vesceritensis</i>		H.E. de <i>Thymus munbyanus</i>	H.E de <i>Dysphania ambrosioides</i> L.	BHT
	Jeune Plante	Plante adulte			
100	0.214 ± 0.01	0.271 ± 0.009	0.21±0.007	0.223±0.009	0.863 ± 0.054
200	0.342 ± 0.025	0.395 ± 0.015	0.54±0.008	0.415±0.012	1.063 ± 0.023
400	0.507 ± 0.014	0.421 ± 0.003	0.79±0.011	0.756±0.010	1.161 ± 0.031
600	0.547 ± 0.007	0.547 ± 0.005	1.18±0.015	0.958±0.015	1.178 ± 0.030

800	0.675 ± 0.013	0.640 ± 0.012	0.48±0.009	1.30±0.012	1.218 ± 0.015
1000	0.715 ± 0.007	0.711 ± 0.016	0.39±0.015	1.36±0.015	1.303 ± 0.055

* : Les résultats sont exprimés en absorbance moyenne à 700 nm de trois répétitions ± l'écart-type

D'après les résultats obtenus (Tableau16) on constate que le pouvoir réducteur augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration, que ce soit pour les huiles essentielles ou le BHT. En effet, l'H.E. de la jeune plante entraîne une absorbance moyenne de 0.214 à une concentration de 100 mg/l, cette valeur passe progressivement à 0.715 à la concentration 1000 mg/l. De même, l'H.E. de la plante adulte passe de 0.271 à 0.711

Quant au BHT, déjà à la faible concentration (100 mg/l), l'absorbance est de 0.863, celle-ci est largement supérieure à toutes les valeurs atteintes par les H.E. même à des concentrations élevées, cela indique un très grand pouvoir réducteur du BHT. L'absorbance enregistrée pour le BHT évolue avec l'élévation de sa concentration Jusqu'à 1.303 à 1000 mg/l, ce qui correspond presque au double des valeurs obtenues par les H.E.

À chaque concentration, les deux huiles essentielles manifestent des valeurs très proches, et par conséquent dans les deux stades végétatifs de la plante, l'H.E. possède les mêmes propriétés réductrices vis-à-vis des ions ferriques.

En générale on constate que l'huile essentielle de la fêrule *Ferula vesceritensis* possède un pouvoir réducteur relativement moyen, par comparaison à d'autres huiles essentielles :

➤ Il est supérieur à certaines H.E., par exemple, l'H.E. de la fêrule endémique de la Turquie *Ferula lycia* Boiss. a révélé une absorbance de 0.137 ± 0.002 à 700 nm et à une concentration de 1000 mg/l (Kose et al., 2010), alors qu'avec la fêrule endémique de l'Algérie (plante étudiée) *Ferula vesceritensis* Coss. on arrive à 0.711 ± 0.016 en utilisant la même concentration 1000 mg/l, cela dit que l'H.E. de *F. vesceritensis* Coss. est dotée d'un pouvoir réducteur cinq fois plus élevé que celui de l'H.E. de *F. lycia* Boiss.

➤ Par ailleurs, les études faites sur le romarin *Rosmarinus officinalis* L. (Outaleb, 2010.), et sur la lavande *Lavandula stoechas* (Menaceur, 2011) montrent que ceux-ci ont un pouvoir réducteur ne dépassant pas 0.400 en termes d'absorbance à 700 nm même à la concentration 1000 mg/l, or avec la fêrule *Ferula vesceritensis*. on enregistre une valeur largement supérieure de 0.711 ± 0.016 .

➤ Toutefois cette valeur est faible comparativement à celle trouvée chez l'armoise blanche *Artemisia herba-alba* 1,015 (Ziani et Raab, 2011). Le pouvoir réducteur de notre H.E.

est probablement freiné par sa faible teneur en monoterpènes connus pour leur fort pouvoir réducteur.

Tableau 19: Tests des effets inter-sujets Variable dépendante: Pouvoir réducteur

Source	Somme des carrés de type III	d	Moyenne des carrés	F	Significatio n
Modèle corrigé	.965	1	8.774E-02	544.942	.000
Constante	8.951	1	8.951	55596.688	.000
A	5.625E-05	1	5.625E-05	.349	.560
B	.943	5	.189	1171.441	.000
A * B	2.203E-02	5	4.405E-03	27.362	.000
Erreur	3.864E-03	24	1.610E-04		
Total	9.920	36			
Total corrigé	.969	35			

D'après les résultats obtenus (Tableau 24) la valeur de signification du facteur A est supérieure à 0.05 alors que les autres significations sont nulles, par conséquent, l'hypothèse H_0^A est acceptée, et les hypothèses H_0^B et H_0^{A*B} sont rejetées :

Le facteur A n'influe pas : le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle n'a pas d'effet sur le pouvoir réducteur.

Le facteur B influe : la concentration de l'huile essentielle a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

Le facteur A*B influe : il y a une interaction entre le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle et la concentration de celle-ci, qui a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

Tableau 20: Tests des effets inter-sujets Variable dépendante: Pouvoir réducteur

Source	Somme des carrés de type III	d	Moyenne des carrés	F	Significatio n
--------	------------------------------	---	--------------------	---	----------------

Modèle corrigé	.965	1	8.774E-02	544.942	.000
Constante	8.951	1	8.951	55596.688	.000
A	5.625E-05	1	5.625E-05	.349	.560
B	.943	5	.189	1171.441	.000
A * B	2.203E-02	5	4.405E-03	27.362	.000
Erreur	3.864E-03	2	1.610E-04		
Total	9.920	36			
Total corrigé	.969	35			

D'après les résultats obtenus (Tableau 24) la valeur de signification du facteur A est supérieure à 0.05 alors que les autres significations sont nulles, par conséquent, l'hypothèse H_0^A est acceptée, et les hypothèses H_0^B et H_0^{A*B} sont rejetées :

Le facteur A n'influe pas : le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle n'a pas d'effet sur le pouvoir réducteur.

Le facteur B influe : la concentration de l'huile essentielle a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

Le facteur A*B influe : il y a une interaction entre le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle et la concentration de celle-ci, qui a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

3.2.2. Cas des extraits éthanoliques :

Nos résultats du test du pouvoir réducteur concernant les extraits éthanoliques de la fêrulle et de l'épazote sont comparés à celui du BHT dans le tableau 17.

Tableau 21 : Pouvoir réducteur des extraits testés et du BHT

Concentration (mg/l)	Absorbance à 700 nm*		
	Extraits de <i>Ferula vesceritensis</i>		Extrait de <i>Dysphania ambrosioides</i> L.
	E1 (Jeune)	E2 (Plante)	
			BHT

	Plante)	adulte)		
100	0.134 ± 0.024	0.205 ± 0.001	0.008±0.001	0.863 ± 0.054
200	0.240 ± 0.015	0.382 ± 0.002	0.024±0.001	1.063 ± 0.023
400	0.584 ± 0.014	0.833 ± 0.010	0.032±0.002	1.161 ± 0.031
600	0.759 ± 0.020	1.242 ± 0.007	0.044±0.012	1.178 ± 0.030
800	1.116 ± 0.027	1.484 ± 0.040	0.085±0.002	1.218 ± 0.015
1000	1.324 ± 0.022	1.969 ± 0.020	0.072±0.001	1.303 ± 0.055

* : Les résultats sont exprimés en absorbance moyenne à 700 nm de trois répétitions ± l'écart-type

Pour chacune des substances, il y a une augmentation de l'absorbance proportionnellement avec l'évolution de la concentration. Cependant la cinétique de

L'augmentation du BHT est faible, c'est-à-dire qu'il évolue, mais avec des petites variations d'une concentration à une autre.

À une concentration faible (100 mg/l) le BHT manifeste un pouvoir antioxydant élevé (0.863 ± 0.054), alors que les extraits ont un effet très faible (0.134 ± 0.024 et 0.205 ± 0.001, pour E₁ et E₂ respectivement) et 0.008±0.001 pour l'extrait d'épazote.

Au fur et à mesure qu'on augmente la concentration, l'activité réductrice des extraits éthanoliques s'élève rapidement pour atteindre à la concentration 600 mg/l des valeurs importantes (0.759 ± 0.020 et 1.242 ± 0.007, pour E₁ et E₂ respectivement) alors que celle de l'épazote reste faible (0.044±0.012), il est à noter que déjà à partir de cette même concentration, l'activité de l'extrait E₂ dépasse

L'activité obtenue par le BHT (1.178 ± 0.030). L'activité de l'extrait E₁ elle aussi arrive à dépasser celle du BHT, mais à la concentration 1000 mg/l (1.324 ± 0.022 contre 1.303 ± 0.055).

À des concentrations élevées (800 et 1000 mg/l), le pouvoir réducteur de l'extrait E₂ est nettement le meilleur par rapport à l'extrait E₁ et à l'antioxydant synthétique BHT.

Il ressort que l'extrait de *Ferula vesceritensis* est muni d'un pouvoir réducteur largement plus puissant que son huile essentielle.

3.3. Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) :

Ce test vise à mettre en évidence la réactivité des substances testées, huiles essentielles ou extraits végétaux, vis-à-vis des aldéhydes libérés par les acides gras (polyinsaturés) suite à une oxydation des lipides. Il est effectué sur un substrat lipidique, dans notre cas c'est le jaune d'œuf qui est utilisé.

Nous avons réalisé ce test pour trois substances actives de la plante étudiée : les H.E. obtenues aux deux stades végétatifs et uniquement l'extrait éthanolique de la jeune plante (E_1), ainsi que l'antioxydant synthétique BHT (en tant que témoin positif). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 22

Tableau 22 : Activité antioxydante des huiles essentielles, de l'extrait éthanolique de la plante étudiée et du BHT par le test TBARS

Concentration (mg/l)	Activité antioxydante (%)*			
	Partie aérienne de <i>Ferula vesceritensis</i>			BHT
	H.E.		Extrait E_1	
	Jeune plante	Plante adulte		
100	-20.7 ± 4.2	24.47 ± 1.22	39.9 ± 1.4	73.1 ± 0.8
200	-11.8 ± 2.5	30.63 ± 1.49	42.8 ± 3.8	80.6 ± 0.3
400	-1.8 ± 1.1	29.66 ± 0.56	51.5 ± 1.6	84.7 ± 0.5
600	-8.9 ± 2.2	30.15 ± 0.28	44.1 ± 2.5	86.3 ± 0.6
800	-12.3 ± 2.6	28.03 ± 0.97	41.2 ± 2.2	88.8 ± 0.3
1000	-15.8 ± 2.1	20.75 ± 1.29	38.7 ± 0.3	91.1 ± 0.1

* : Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de trois répétitions ± l'écart-type

D'après nos résultats (tableau 18), l'antioxydant synthétique utilisé comme standard BHT manifeste une activité antioxydante importante qui évolue graduellement de 73.1 ± 0.8 à 91.1 ± 0.1 % de manière proportionnelle à l'augmentation de sa concentration de 100 à 1000 mg/l.

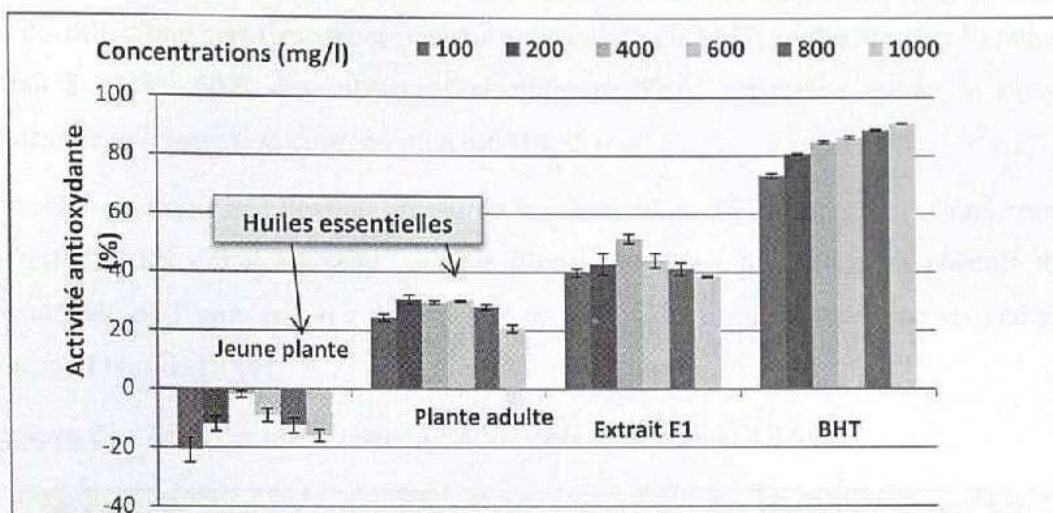


Figure 25 : Comparaison de l'activité antioxydante par le test TBARS (%) du BHT, des huiles essentielles, et de l'extrait éthanolique de *F. vesicertensis* Coss.

En ce qui concerne l'H.E. extraite de la jeune plante, elle montre un comportement totalement différent. En effet, elle possède un effet antioxydant négatif quelque soit la dose utilisée, c'est-à-dire qu'elle engendre un effet oxydant en favorisant la formation d'aldéhydes (Malonaldéhyde ou MA), qui eux interagissent avec le Thiobarbiturique acide (TBA). Toutefois cet effet inverse diffère d'une concentration à une autre : à la plus faible concentration (100 mg/l), on enregistre une activité antioxydante de $-20.7 \pm 4.2 \%$, cette activité remonte au fur et à mesure de l'accroissement de la dose, jusqu'à $-1.8 \pm 1.1 \%$ à la dose 400 mg/l. Au-delà de 400 mg/l, l'H.E. n'est désormais plus antioxydante, mais contrairement, elle favorise davantage l'oxydation des lipides.

En revanche, l'H.E. obtenue de la plante au stade jeune révèle une activité antioxydante dépassant les 20 % quelque soit sa concentration. Le maximum de l'activité qui est d'environ 30 % est donné par les concentrations 200, 400 et 600 mg/l, toutefois au-delà de cette dernière on constate une diminution appréciable du pourcentage de l'effet antioxydant.

Alors que l'extrait phénolique possède comme même une activité notable dont le maximum est enregistré en utilisant la concentration 400 mg/l. à la dose de 100 mg/l il possède une activité de $39.9 \pm 1.4 \%$, celle-ci évolue jusqu'à arriver au maximum $51.5 \pm 1.6 \%$ à la dose 400 mg/l, où l'extrait est capable d'inhiber un peu plus que la moitié des produits secondaires issus de l'oxydation des lipides du jaune d'œuf (notamment les aldéhydes). En revanche, au-delà de 400 mg/l, l'activité antioxydante commence à baisser sensiblement.

La détermination des IC_{50} donne une valeur de 57.72 mg/l pour le BHT, et de 314.85 mg/l pour l'extrait E₁. La valeur de l' IC_{50} de l'extrait est donc cinq fois plus élevée que celle du BHT, ce

qui dévoile d'une part l'excellent pouvoir antioxydant du BHT, et d'autre part l'aptitude de notre extrait à inhiber 50 % des substances réactives au TBA (substances issues de l'oxydation des lipides) de se former si sa concentration est 314.85 mg/l.

Nous pensons que l'extrait obtenu de la plante adulte (E₂) aura mieux donné comme résultat du test TBARS s'il a été testé, puisque d'une part il est plus riche en phénols totaux et en flavonoïdes, et d'autre part il a déjà montré un bon pouvoir réducteur et une activité vis-à-vis des radicaux libres de DPPH.

Tableau 23 : Tests des effets inter-sujets Variable dépendante: TBARS

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Significatio n
Modèle corrigé	2781.583	11	252.871	82.820	.000
Constante	44511.089	1	44511.089	14578.268	.000
A	2235.512	1	2235.512	732.175	.000
B	448.699	5	89.740	29.392	.000
A * B	97.371	5	19.474	6.378	.001
Erreur	73.278	24	3.053		
Total	47365.95	36			
	0				
Total corrigé	2854.861	35			

a R deux = .974 (R deux ajusté = .963)

D'après les résultats obtenus (Tableau 25) toutes les valeurs de signification sont inférieures à 0.05, par conséquent, les hypothèses H_0^A, H_0^B et H_0^{A*B} sont rejetées :

Le facteur A influe : le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle a un effet significatif sur l'activité antioxydante par le test TBARS.

Le facteur B influe : la concentration de l'huile essentielle a un effet significatif sur l'activité antioxydante par le test TBARS.

Le facteur A*B influe : il y a une interaction entre le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle et la concentration de celle-ci, qui a un effet significatif sur l'activité oxydante par le test TBARS.

4. Évaluation et comparaison de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la férule et celle du thym :

D'après la recherche bibliographique effectuée sur la plante étudiée, il semble que c'est la première fois que l'H.E. de cette espèce soit analysée de point de vue

propriétés antimicrobiennes. Pour ce faire nous avons opté pour une étude qualitative par la méthode des disques ou aromatogramme (test de sensibilité), et quantitative par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) dont le principe et le mode opératoire est détaillé dans le chapitre précédent, et nous avons choisi l'H.E. du thym *Thymus mumbyanus* Desf. comme standard. Cette dernière est connue par son excellent pouvoir bactéricide et fongicide, elle va servir pour la comparaison de nos résultats.

4.1. Estimation du pouvoir antimicrobien des l'H.E. par le test de sensibilité (étude qualitative):

Le présent test vise à estimer de manière générale un éventuel effet bactériostatique et/ou fongistatique des H.E. en mesurant le diamètre de la zone où aucune croissance microbienne n'est visible. La figure 26 présente l'ensemble de nos résultats concernant les diamètres d'inhibition des différentes souches microbienne par les H.E.

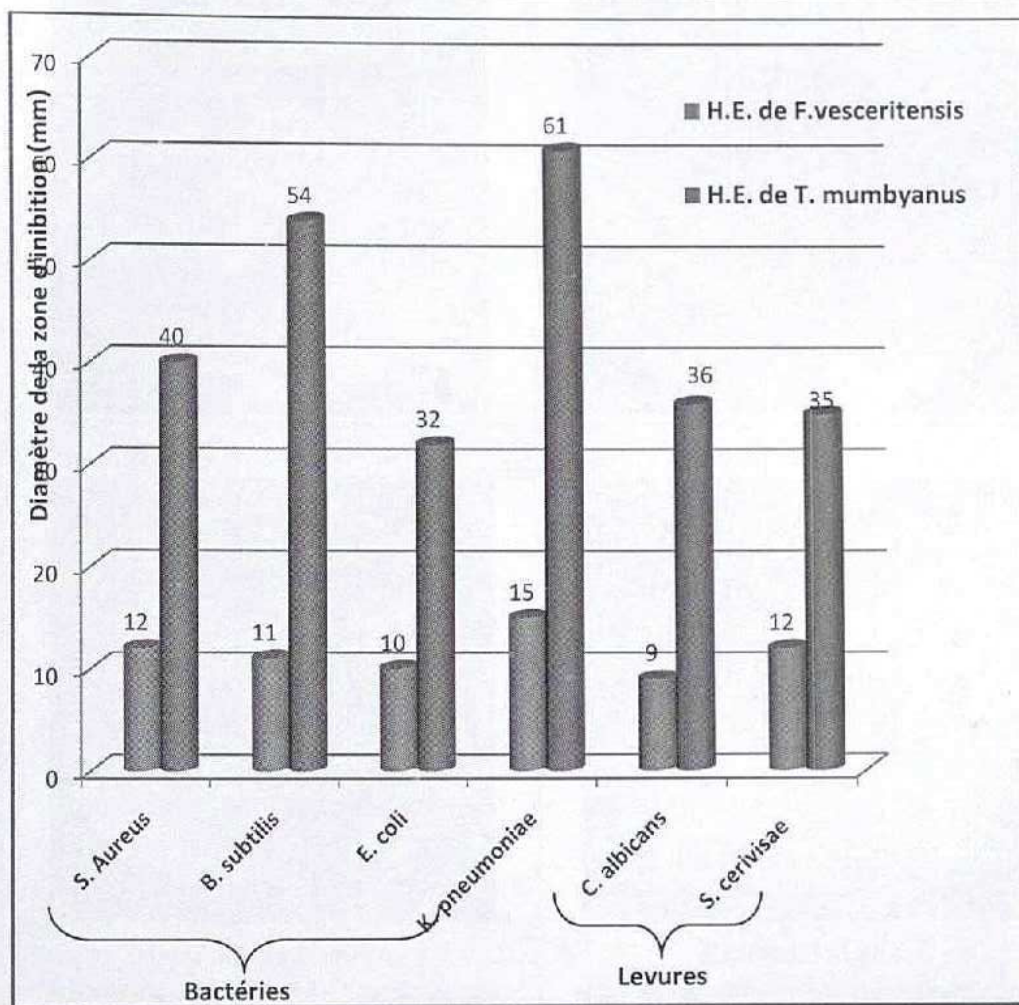


Figure 26 : Diamètre d'inhibition des microorganismes testés par les huiles essentielles

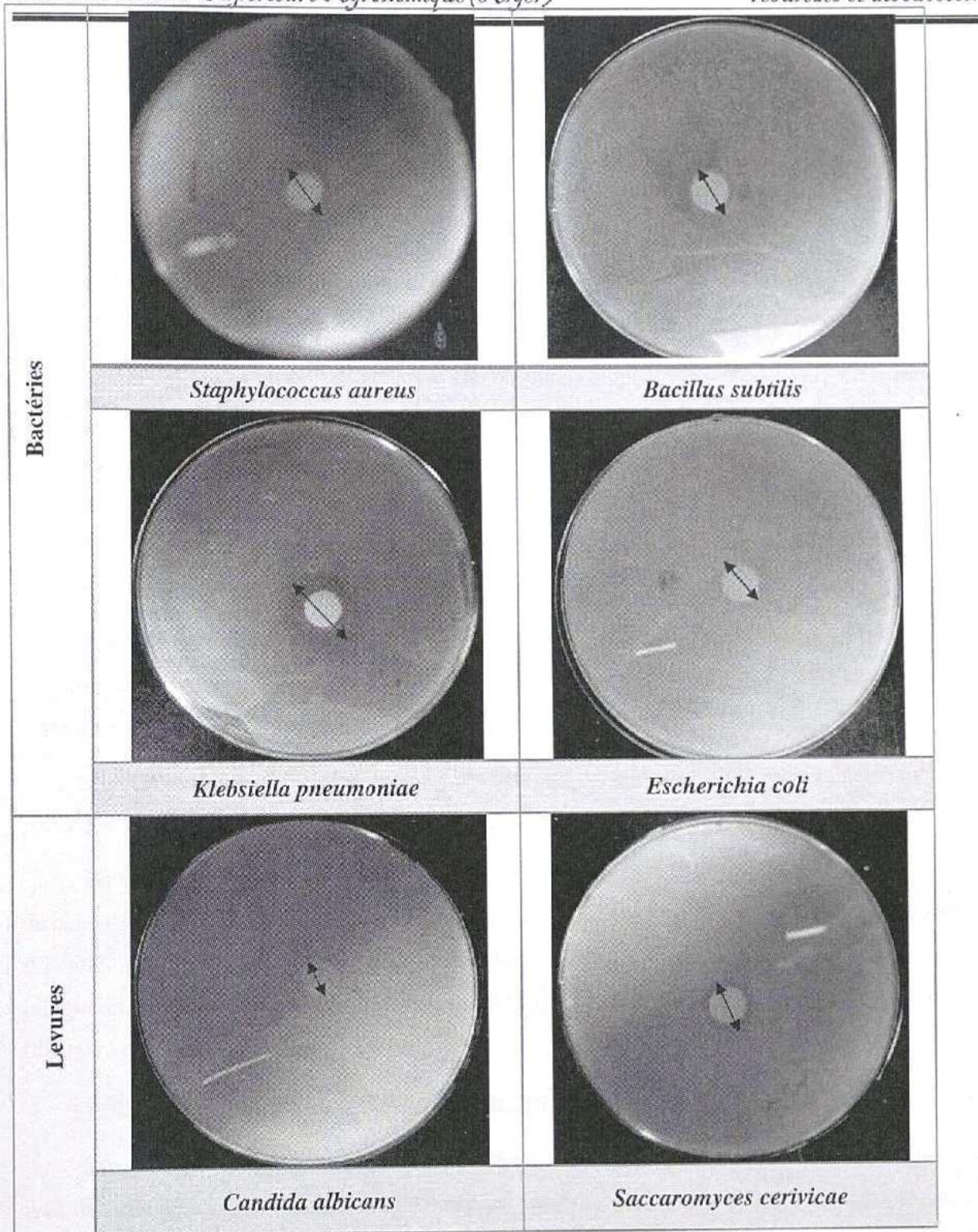


Figure 27 :Zones d'inhibition des différents microorganismes testés par l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis* Coss.

D'après l'histogramme précédent (figure 26) qui représente une comparaison des diamètres de la zone d'inhibition pour chaque souche testée on remarque la différence est extrêmement

importante entre l'effet inhibiteur de l'H.E. de la fêrule *Ferula vesceritensis* Coss. (plante testée) (figure 27), et celui du thym *Thymus numbyanus* (H.E. utilisé comme référence). Cela est marqué tant pour les bactéries que pour les levures.

En effet, au moment où le thym montre des zones d'inhibition claires dans les boîtes de pétri avec des grands diamètres allant de 32 mm (le cas de la zone d'inhibition d'*E. coli*) à 61 (le cas de la zone d'inhibition de *K. pneumoniae*), la fêrule entraîne une faible inhibition dont les diamètres ne dépassent pas les 15 mm.

Pour le cas des bactéries, on remarque que la souche la plus résistante à l'H.E. de la fêrule est *Escherichia coli*, qui révèle une croissance notable avec un diamètre de 10 mm, c'est-à-dire à moins de 1 mm autour des disques. Cela indique que l'H.E. de la fêrule possède un très faible pouvoir antiseptique contre cette espèce bactérienne réputée par ses propriétés commensales du tube digestif, et de son aptitude à y entraîner des troubles, suite à l'acquisition d'une résistance (gènes de résistances) même à certains antibiotiques.

Par ailleurs, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* qui sont deux bactéries de Gram positifs, révèlent une légère sensibilité, avec des diamètres d'inhibition de 12 et 11 mm, respectivement.

En revanche, la seule souche qui s'est révélée plus ou moins sensible relativement aux autres par ce test qualitatif est *Klebsiella pneumoniae*, pour laquelle le diamètre d'inhibition est de 15 mm.

En outre, le comportement des deux levures testées envers l'H.E. de la fêrule ne diffère pas de celui des bactéries, car on enregistre une faible inhibition avec *Saccaromyces cervicae* (diamètre d'inhibition égale à 12 mm). Alors que l'effet inhibiteur contre *Candida albicans* est quasiment nul, puisque celle-ci a envahi presque toute la boîte de pétri en ne laissant que le diamètre du disque (diamètre d'inhibition = 9 mm)

4.2. Évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne des H.E. (CMI) :

Pour pousser davantage nos analyses, et dans le but d'une investigation de l'exacte dose au-delà de laquelle toute croissance microbienne est inhibée, nous avons procédé à la détermination des valeurs des CMI contre chaque souche testée (Concentration Minimale Inhibitrice) pour les deux huiles essentielles, et ce tout en se basant sur les résultats du test qualitatif. Le tableau 19 regroupe les résultats obtenus concernant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles :

Souches	Concentration de l'H.E. dans les milieux de culture (%)
---------	---

		H.E. de <i>Ferula vesceritensis</i>							H.E. de <i>Thymus mumbyanus</i> (standard)						
		0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1.00	2.00	0.03	0.06	0.125	0.25	0.50	1.00	2.00
Bactéries	<i>Staphylococcus Aureus</i>	P	P	CMI	A	A	A	A	P	P	CMI	A	A	A	A
	<i>Bacillus subtilis</i>	P	P	P	CMI	A	A	A	P	P	P	CMI	A	A	A
	<i>Escherichia coli</i>	P	P	P	P	P	P	CMI>2	P	P	P	CMI	A	A	A
	<i>Klebseilla pneumoniae</i>	P	P	P	CMI	A	A	A	P	P	P	CMI	A	A	A
Levures	<i>Candida albicans</i>	P	P	P	P	P	P	CMI>2	CMI<0,03	A	A	A	A	A	A
	<i>Saccaromyces cervisiae</i>	P	P	CMI	A	A	A	A	CMI<0,03	A	A	A	A	A	A

Tableau24 : Détermination des CMI des souches testées par les deux huiles essentielles

P : présence d'une croissance microbienne ; A : Absence de toute croissance microbienne.

Tableau 25 : Valeurs des concentrations minimales inhibitrices

CMI des Souches microbiennes (%)	Bactéries				Levures	
	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebseilla pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Saccaromyces cervisiae</i>
H.E. de <i>Ferula vesceritensis</i>	0.125	0.25	CMI>2	0.25	CMI>2	0.125
H.E. de <i>Thymus mumbyanus</i> (standard)	0.125	0.25	0.25	0.25	CMI<0,03	CMI<0,03

L'huile essentielle du thym s'est révélée capable d'entraîner une inhibition totale de la croissance de tous les microorganismes testés par des doses inférieures ou égales à 0.25 %. En effet,

à l'exception de *Staphylococcus aureus* qui manifeste plus de sensibilité avec une CMI de 0.12 % de l'H.E., les autres bactéries révèlent des CMI de 0.25 %.

Alors que l'effet de cette même huile contre les levures testées est extraordinaire, puisque la croissance de celles-ci est freinée par toutes les concentrations utilisées. Cela dit que les CMI de l'H.E. du thym contre les levures sont inférieures à la plus faible concentration utilisée (CMI < 0.03 %)

Ordre décroissant de l'action biocide de l'H.E. du thym :

Saccaromyces cerevisiae = *Candida albicans* > *Bacillus subtilis* = *Escherichia coli* =
Klebseilla pneumoniae > *Staphylococcus Aureus*

Quant à l'huile essentielle de la férule, elle montre les mêmes valeurs de CMI que l'H.E. contre les bactéries testée, à l'exception d'*Escherichia coli* qui s'est développé même à la plus grande concentration utilisée, ce qui signifie que cette bactérie est extrêmement résistante à l'H.E. de la férule et possède une CMI supérieure à 2 %.

Pour le cas des levures, elles se comportent différemment en présence de l'H.E. de la férule dans le milieu. Cette huile a entraîné une inhibition de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* à partir de la dose 0.125 % (CMI = 0.125). Cependant, la levure *Candida albicans* ne révèle aucune sensibilité quelque soit la dose utilisée, cela confirme nos constatations dans le test qualitatif.

Ordre décroissant de l'action biocide de l'H.E. de la férule :

Staphylococcus Aureus = *Saccaromyces cerevisiae* > *Klebseilla pneumoniae* =
Bacillus subtilis > *Escherichia coli* > *Candida albicans*

De manière générale, on constate une activité antimicrobienne non négligeable de l'H.E. de la férule, mais elle reste faible comparativement au standard utilisé (thym), et cela s'explique par la richesse de ce dernier en monoterpènes doués d'un très bon pouvoir antimicrobien tel que le thymol, le carvacrol, et l' α -Terpineol qui représente les composés majoritaires de l'H.E. des espèces de thym (Bakkali et al., 2007; Meziane et Naimi H., 2011 ;). Or nous n'avons pas identifié de tels composés dans l'étude de la composition chimique de l'H.E. de la férule.

**4.3. Comparaison de nos résultats avec ceux obtenus sur d'autres espèces du genre
Ferula :**

Selon Kose et al. (2010), l'H.E. de *Ferula lycia* a entraîné une zone d'inhibition de *Staphylococcus aureus* de 9 à 10 mm de diamètre (le diamètre des disques est de 6 mm). l'H.E. de *Ferula assafoetida* (partie aérienne) présente des zones d'inhibition de 16, 17.6 et 18 mm de diamètre vis-à-vis de la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*. (dont le diamètre des disques est de 8 mm) (Singh Kunwar, et al., 2010).

Selon les études menées par Abedi D., et al. (2008) sur l'H.E. de *Ferula gumosa*, la CMI de *Staphylococcus aureus* est de 1.56 µl/ml ce qui correspond à 0.156 %, cette valeur est supérieure que celle donnée par l'H.E. étudiée 0.125 % et par conséquent l'H.E. étudiée est plus active contre cette bactérie. Néanmoins, la CMI donnée par *Ferula gumosa* contre *Escherichia coli* est 12.50 µl/ml = 1.250 %, ce qui entraîne une activité antimicrobienne plus importante que *Ferula vesceritensis* qui montre une CMI > 2 %.

Le tableau 21 illustre l'activité antimicrobienne des divers H.E. du genre *Ferula* contre les souches qu'on utilisé.

Tableau 26 : Effet antimicrobien de quelques H.E. du genre *Ferula* contre les souches testées

H.E. du genre férula	Bactéries Gram+		Bactéries Gram-		Levures
	Staphylococcus Aureus	Bacillus subtilis	Escherichia coli	Klebseilla pneumoniae	Candida albicans
<i>F. badrakema</i> (fruits)	*	-	o	-	*
<i>F. glauca</i>	o	***	*	-	o
<i>F. latisecta</i> (fruits)	**	-	o	-	*
<i>F. latisecta</i> (partie aérienne)	*	***	*	*	-
<i>F. gummosa</i> (fruits)	***	***	***	-	***
<i>F. gummosa</i> (gaines)	**	**	**	-	-
<i>F. szowitsiana</i> (Feuilles)	***	-	**	-	-
<i>F. szowitsiana</i> (partie aérienne)	**	***	*	-	-
<i>F. lycia</i>	*	-	o	-	-
<i>F. assafoetida</i> (plante entière)	**	**	o	-	**
<i>F. assafoetida</i> (graines)	**	**	*	-	-

*** : excellente activité ; ** : bonne activité ; * : modérément active ; o : non active ; - : effet

inconnu

(Sources : Sahebkar A. et Iranshahi M., 2010 ; Kose E.O., et al., 2010 ; Singh Kunwar P., et al., 2010 ; Ur Rahman M., et al., 2008)

D'après le tableau, on note que les bactéries Gram positives (*Staphylococcus Aureus* et *Bacillus subtilis*) représentent les espèces les plus sensibles aux huiles essentielles du genre *Ferula*, comme c'est le cas avec la plante étudiée. Certaines plantes partagent avec *F. vesceritensis* la non ou la faible activité de l'H.E. vis-à-vis de la bactérie du Gram négatif *Escherichia coli*, c'est le cas de *F. badrakema*, *F. glauca*, *F. latisecta*, *F. lycia* et *F. assafoetida*. En revanche, d'autres espèces de fêrulle comme *F. gummosa*, et *F. szowitsiana* présentent un bon pouvoir bactériostatique contre cette bactérie. Et selon les études effectuées, deux espèces de fêrules seulement ont montré une bonne activité inhibitrice contre la levure *Candida albicans*, qui est la souche la plus résistante selon Sahebkar A. et Iranshahi M. (2010), il s'agit de *F. gummosa* et *F. assafoetida*.

5.Évaluation et comparaison de l'activité insecticide de l'huile essentielle de la fêrulle et celle du thym :

Nous avons étudié et comparé l'activité des huiles essentielles des deux plantes : la fêrulle (*Ferula vesceritensis* Coss.) et le thym (*Thymus mumbyanus* Desf.), contre le charançon du riz (*Sitophilus oryzae*). L'évaluation et la comparaison de l'efficacité des H.E. ont été basées sur la détermination de leurs doses létales (DL₅₀ et DL₉₀) et de leurs temps létaux (TL₅₀ et TL₉₀) tirés de la courbe de régression des probits en fonction des logs des doses ou des logs des temps (Finney .. 1971).

5.1Évaluation de la toxicité des huiles essentielles par contact sur *Sitophilus oryzae* :

5.1.1L'huile essentielle de la fêrulle (*Ferula vesceritensis* Coss.) :

D'après nos résultats obtenus sur la réponse du charançon du riz (*Sitophilus oryzae*) aux différentes concentrations en huile essentielle de la fêrulle, on constate que celle-ci entraîne, déjà après 24 heures d'exposition, la mortalité de 2.5 % des individus traités par la dose D₂ = 0.126 µl/cm², et 5 % des individus par la dose D₄ = 0.503 µl/cm².

La figure 28 montre l'effet de chaque dose utilisée sur la mortalité des insectes en fonction du temps. On remarque que l'action de l'H.E. sur la vitalité des insectes s'accroît de plus en plus, au fur et à mesure qu'augmente la durée de l'exposition.

Et au bout de 120 heures (5 jours de traitement), on enregistre une mortalité de 9.21 %, 18.42 %, 35.52 % et 84.21 % sous l'effet des doses 0.063, 0.126, 0.251 et 0.503 µl/cm²,

respectivement. Cela indique que cette H.E. possède un effet insecticide, mais qu'il agit avec le temps.

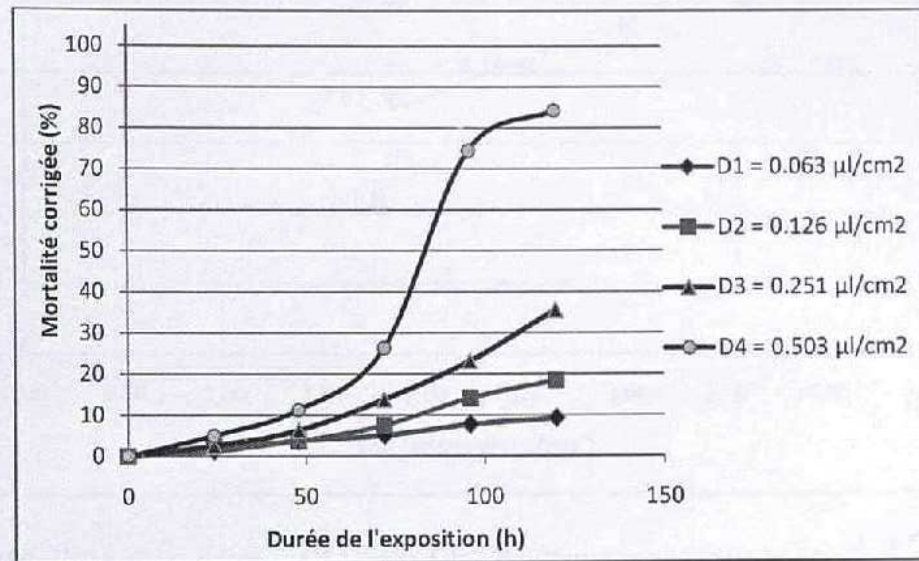


Figure 28: Activité insecticide de différentes concentrations de l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis* Coss. Sur *Sitophilus arYZae* par contact

On note que plus on augmente la dose de l'H.E. plus sera grand l'effet de celle-ci. Toutefois, la dose la plus efficace est $D_4 = 0.503 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ qui induit 84.21 % de mortalité, soit un peu plus que le double (2.5 fois) de l'effet de la dose $D_3 = 0.251 \mu\text{l}/\text{cm}^2$.

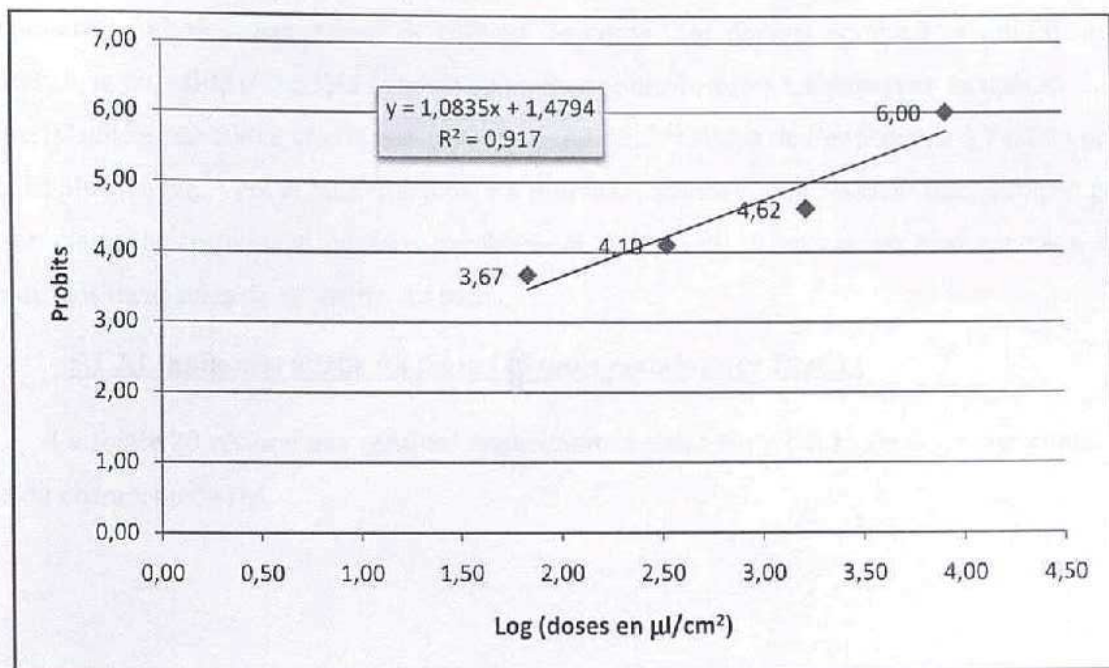


Figure :29 :Détermination de la DL₅₀ et la DL₉₀ de l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis* Coss. par l'effet "contact" sur *Sitophilus oryzae*

D'après la figure 29 qui représente la courbe de régression de l'évolution des probits en fonction des logarithmes des doses en H.E., la détermination des doses létales DL₅₀ et DL₉₀ révèle que celles-ci ont respectivement les valeurs suivantes : 0.26 et 0.84 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$.

➤ Comportement des insectes au cours du traitement :

Juste après le dépôt des insectes dans les boîtes de pétri sur le papier filtre traité par l'H.E., on a observé qu'ils sont extrêmement dérangés par l'effet contact et par la forte odeur qui règne dans le milieu, les insectes se mettent en mouvement dans toutes les directions afin de trouver un refuge. Certains individus s'échappent au contact en montant sur la face intérieure du couvercle ou sur les parois de la boîte, alors que d'autres entrent sous le papier filtre.

Plus la dose en H.E. s'élève, plus on observe une diminution de l'activité de l'insecte comparativement aux témoins (boîtes non traitées) où les individus bougent plus vigoureusement, se regroupent, et par fois se mettent en accouplement. En outre, à partir du deuxième jour (48 heures), nous avons constaté que certains individus se retournent très difficilement en cas de renversement, et d'autres meurent très lentement et de façon boiteuse. Au moment du comptage certains individus se comportent comme morts, mais lorsqu'on chatouille leurs pattes à l'aide d'une pince entomologique, ils manifestent des frissons indiquant ainsi leur vitalité. D'ailleurs c'est ce critère qui est adopté dans nos jugements. Au cours du temps, d'autres symptômes viennent

s'ajouter : paralysie, changement de couleur du corps (qui devient sombre) et solidification des pattes..., la mortalité s'accélère suite à l'impuissance des insectes à s'échapper au contact du papier filtre (s'adhérer au couvercle ou aux parois) ce qui rend la durée de l'exposition à l'effet contact de l'H.E. plus longue. Vers le huitième jour, les individus qui survivent révèlent une faiblesse générale assez claire du corps avec ou sans tremblement des pattes, et en cas de renversement, ils sont désormais incapables de se mettre sur pieds.

5.1.2.L'huile essentielle du thym (*Thymus mumbyanus* Desf.) :

La figure 30 résume nos résultats concernant la toxicité de l'H.E. de thym par contact vis-à-vis du charançon du riz.

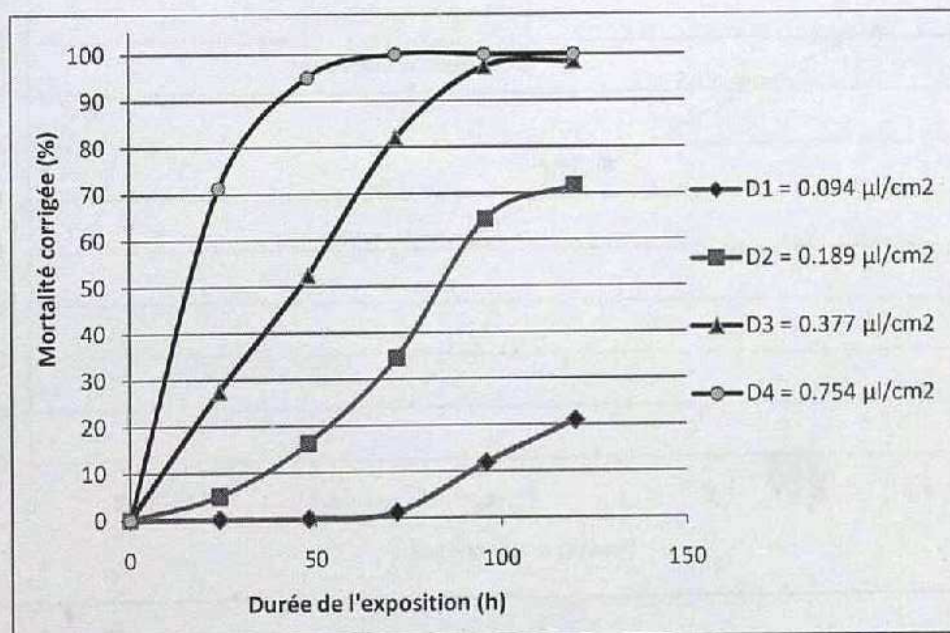


Figure 30: Activité insecticide de différentes concentrations de l'huile essentielle de *Thymus mumbyanus* Boiss.et Reut. Sur *Sitophilus aryzae* par contact

D'après cette représentation, il ressort que le pourcentage de mortalité des insectes s'élève graduellement avec l'augmentation de la dose de l'H.E. utilisée, mais aussi avec l'augmentation de la durée de traitement.

On remarque que la plus faible dose $D_1 = 0.94 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ n'entraîne aucune mortalité avant 96 heures de contact. Cependant à l'exception de cette dose, les autres doses $D_2 = 0.189$, $D_3 = 0.377$ et $D_4 = 0.754 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ont un effet toxique relativement immédiat qui s'élève rapidement au cours de la durée du traitement pour atteindre au bout de 24 heures 5 %, 27.5 % et 71.25 % de mortalité, respectivement.

La dose la plus efficace est $D_4 = 0.754 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ qui conduit à 100 % de mortalité seulement au bout de 72 heures. La dose qui vient en deuxième position est $D_3 = 0.377 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ qui entraîne le même pourcentage de mortalité (100 %) en 96 heures.

La détermination des doses létales du thym la (figure 31) montre que la valeur de la DL_{50} est $0.14 \mu\text{l}/\text{cm}^2$, alors que celle de la DL_{90} est $0.27 \mu\text{l}/\text{cm}^2$. Ceci reflète une bonne toxicité de l'H.E. du thym sur le charançon du riz.

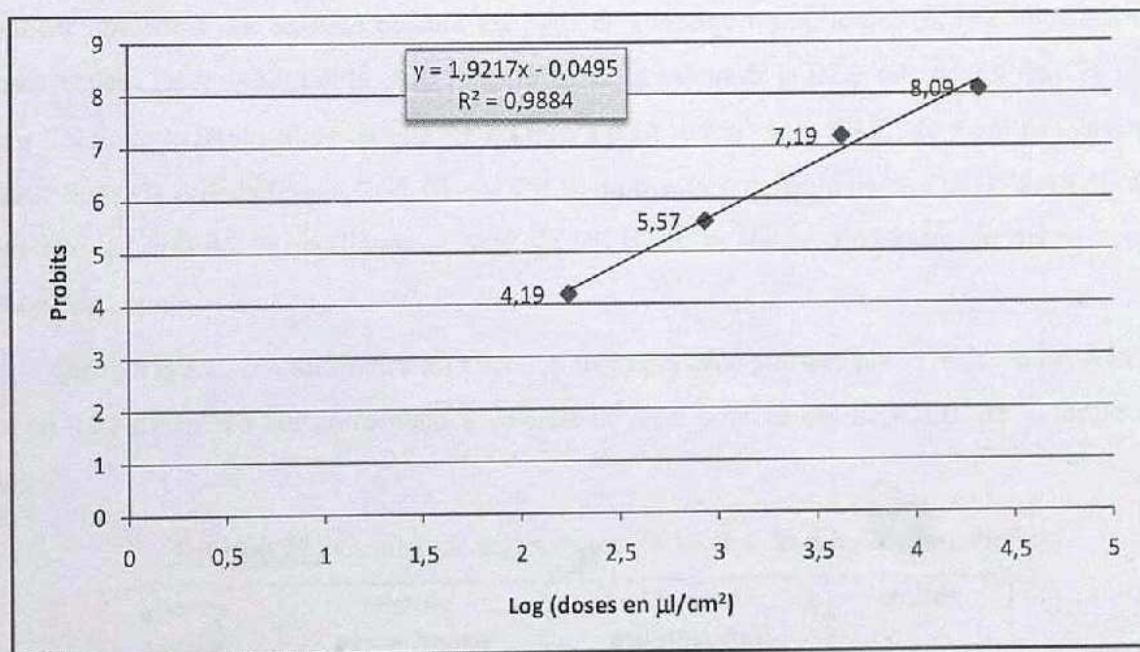


Figure :31 Détermination des DL_{50} et DL_{90} de l'huile essentielle de *Thymus mumbyanus* Boiss.et Reut. par l'effet contact sur *Sitophilus oryzae*

➤ **Comportement des insectes au cours du traitement :**

En traitant l'insecte par l'H.E. du thym nous avons observé, dès la première heure, que les individus sont gênés, et presque les mêmes symptômes provoqués par l'H.E. de la férule apparaissent, mais cette fois-ci l'effet semble être plus intense et plus rapide.

Au bout de 24 heures presque tous les individus survivants traités par la dose $D_2 = 0.189 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ sont incapables de se mettre sur leurs pattes. Ainsi après 48 heures de traitement on a constaté que malgré la plus faible dose utilisée $D_1 = 0.094 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ne montre aucune mortalité, les individus traités sont très mal à l'aise, et marche avec boitillement.

L'H.E. du thym entraîne aussi un changement remarquable de la couleur du corps de l'insecte qui va du brun au brun-noir sombre avec un aspect brillant, et il s'agit probablement d'une action directe de l'H.E. sur la cuticule de *Sitophilus oryzae*. Par ailleurs, quelques boîtes de pétri montrent certains individus morts avec les ailes étalées.

5.1.3. Discussion et comparaison de l'effet toxique induit par contact par les deux huiles essentielles :

L'analyse de nos résultats obtenus confirme très clairement que les deux huiles essentielles étudiées possèdent une toxicité notable vis-à-vis de l'insecte traité, toutefois, la comparaison des doses létales (Tableau 22) fait la différence. En effet, la valeur de la DL_{50} est estimée de $0.26 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ pour l'H.E. de la férule, alors qu'elle est estimée à $0.14 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ pour l'H.E. du thym soit environ la moitié de la DL_{50} de la férule. Ceci dit que l'H.E. du thym est capable de tuer par contact 50 % des individus en utilisant la moitié de la dose de l'H.E. de la férule conduisant au même seuil de mortalité.

Quant à la DL_{90} , la différence est encore plus importante puisque pour l'H.E. du thym la DL_{90} est de $0.27 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ce qui correspond à environ un tiers pour le cas de l'H.E. de la férule ($0.84 \mu\text{l}/\text{cm}^2$).

Tableau 27 : Comparaison des doses létales des deux huiles essentielles

Doses létales	<i>Ferula vesceritensis</i>	<i>Thymus mumbyanus</i>	Unités
DL_{50}	16.4	8.76	$\mu\text{l}/\text{ml}$
	0.26	0.14	$\mu\text{l}/\text{cm}^2$

DL ₉₀	53.45	17.15	µl/ml
	0.84	0.27	µl/cm ²

En général, on considère que l'H.E. du thym est doué d'une bonne activité insecticide par contact, cette activité est plus efficace que celle de l'H.E de la férule qui , possède aussi une activité non négligeable, mais qu'elle agit avec le temps.

La toxicité de l'H.E. du thym est éventuellement due à sa composition chimique assez riche en certains monoterpènes tels que le thymol, le carvacrol, et l' α -Terpineol qui représentent les composés majoritaires, ces composés sont réputés pour leurs propriétés biologiques extraordinaires (activité antimicrobienne et antifongique) (Bakkali et al., 2007; Meziane et Naimi H., 2011 ;). Or nous n'avons pas identifié de tels composés dans l'étude de la composition chimique de l'H.E. de la férule.

En outre, l'huile essentielle de la férule qu'on a utilisé nous l'avons extrait à partir d'une jeune plante (mois de décembre) et nous avons trouvé qu'elle est constituée de Shyobunol comme composé prédominant (18.1 %), ce dernier disparaît totalement dans l'H.E. obtenue à partir de la plante adulte où d'autres composés majoritaires apparaissent comme le viridiflorol (13.4 %), cela nous conduit à dire que la composition chimique de l'H.E. est très différente d'un stage végétatif à l'autre. Par conséquent, l'étude de l'effet insecticide de cette plante ainsi évalué, pourra donner des résultats meilleurs si elle a été réalisée sur une H.E. obtenue à partir de la plante adulte.

Une étude de l'activité insecticide de l'H.E. de la gousse d'ail vis-à-vis de *Sitophilus oryzae* révèle une DL₅₀ de 2.24 µl/ cm² (Cardiet et al., 2011) cette dose est extrêmement élevé par rapport à nos résultats (2.24 >>> 0.26 et 0.14 µl/ cm²), ce qui montre que nos huiles essentielles étudiées sont plus efficaces contre le charançon du riz.

Cependant, cet effet toxique des deux huiles essentielles étudiées reste très faible comparativement à d'autres huiles essentielles comme celle de la menthe *Mentha viridis* qui donne une DL₅₀ de 0.239 µl/ml contre le charançon du riz, après une semaine de traitement. (0.239 <<< 16.4 et 8.76 µl/ml) (Derbalah et Ibrahim Ahmed, 2011).

5.2.Évaluations de la toxicité des huiles essentielles par inhalation sur *Sitophilus oryzae* :

5.2.1.L'huile essentielle de la fêrûle (*Ferula vesceritensis* Coss.) :

Une fois les insectes sont déposés dans les piluliers saturés en vapeur d'H.E., on a observé un comportement semblable à celui décrit pour le test de contact.

Malgré que les insectes nous semblent très agités sous l'action de l'H.E. dès leur introduction dans les piluliers, au bout de 24 heures, tous les individus gardent leur vitalité et leur activité. En revanche, après 48 heures on a comptabilisé 5.06 % de mortalité, ce pourcentage s'élève au cours de la durée du traitement pour atteindre 36.49 % à la 96^{ème} heure, puis 89.71 % à la 192^{ème} heure. Cela dit que le pourcentage de la mortalité progresse rapidement à partir de 48 heures de traitement de manière linéaire comme le montre la (figure 32).

Les temps de l'exposition qui entraînent la mortalité de 50 % et 90 % de la population étudiée (TL₅₀ et TL₉₀) sont extraits de la courbe de régression de l'évolution des probits en fonction des logarithmes des temps de traitement (figure 32). le TL₅₀ a été trouvé égale à 107 heures et 50 min, alors que le TL₉₀ est de 198 h et 51 min.

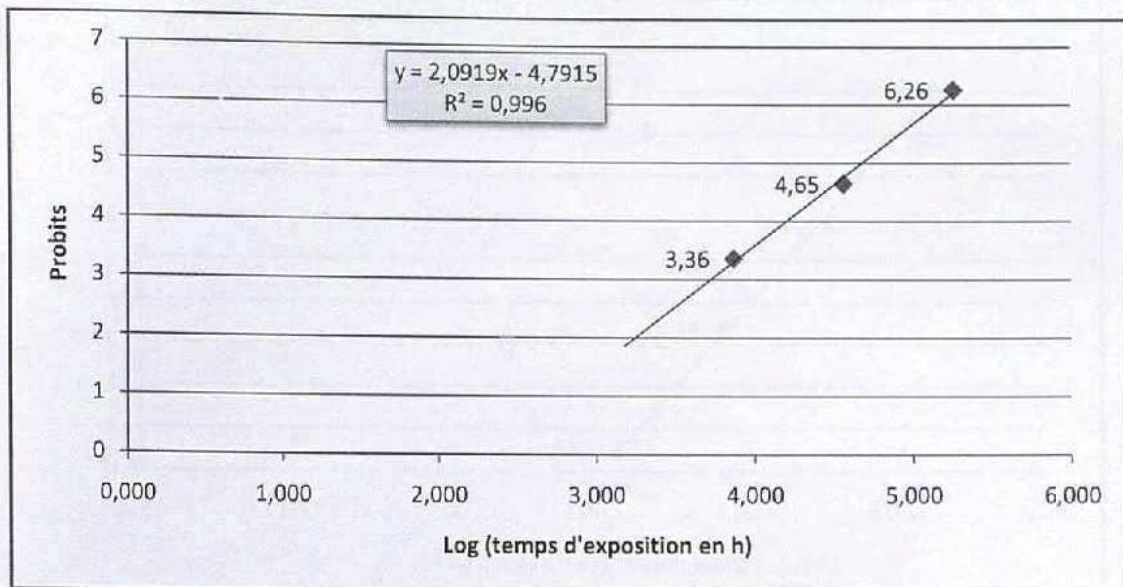


Figure 32 : Détermination du TL_{50} et du TL_{90} de l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis* Coss. par inhalation sur *Sitophilus oryzae*

5.2.2.L'huile essentielle du thym (*Thymus mumbyanus* Boiss.et Reut.) :

Les symptômes qui apparaissent sur l'insecte ainsi que son comportement causé suite à l'inhalation de l'H.E. du thym ne diffèrent pas de ceux constatés lors du test de contact.

Après 24 heures de l'exposition des insectes à l'atmosphère chargée en huile essentielle du thym, nous avons enregistré une très faible mortalité (1.25 %), celle-ci s'élève légèrement à 5.06 % vers la 48^{ème} heure. Cependant, à partir de 48 heures de traitement on remarque une augmentation brusque de l'effective des individus morts qui atteint au bout de 96 heures 79.73 %, et après 192h d'inhalation on aura 100 % de mortalité. La figure 33 illustre cette évolution de la mortalité.

Le calcul des temps létales entraîné par l'inhalation des vapeurs de l'H.E. du thym a abouti aux valeurs suivantes : $TL_{50} = 73$ h et 13 min, $TL_{90} = 100$ h et 9 min.

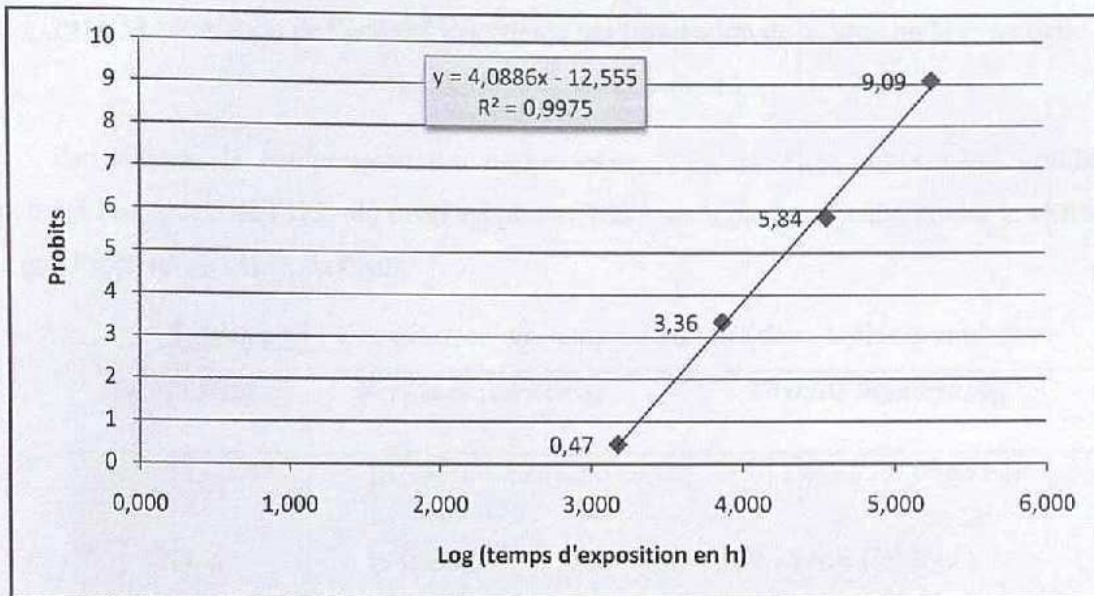


Figure 33 : Détermination des TL_{50} et TL_{90} de l'huile essentielle de *Thymus mumbyanus* Boiss. et Reut. par inhalation sur *Sitophilus oryzae*

5.2.3. Discussion et comparaison de l'effet toxique induit par inhalation par les deux huiles essentielles étudiées :

D'après la représentation graphique de l'évolution de la mortalité en fonction du temps (Figure 34), il ressort que les deux huiles essentielles étudiées ont une toxicité remarquable par inhalation vis-à-vis de l'insecte traité. Avant 48 heures, aucune différence n'est remarquée entre l'effet de fumigation des deux huiles essentielles. Toutefois, après 48 heures de traitement, les pentes des deux courbes indiquent que l'H.E. du thym est désormais plus agressif que la férule.

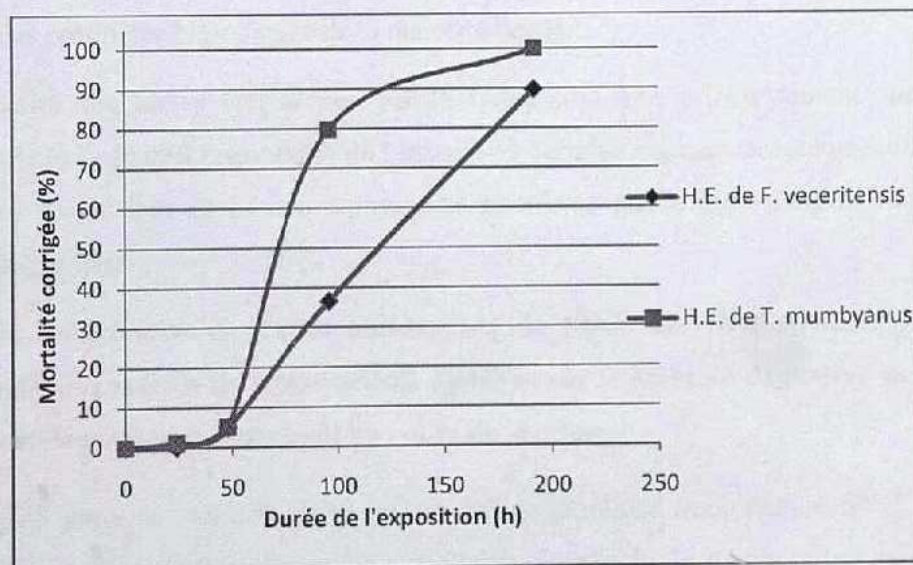


Figure 34 : Variation de l'activité insecticide par fumigation de chaque huile essentielle étudiée contre le charançon du riz

Par ailleurs, la comparaison des temps létaux TL_{50} et TL_{90} (tableau 23), confirme que l'activité insecticide de l'H.E. du thym est plus efficace aussi par fumigation contre le charançon du riz que l'activité de l'H.E. du thym.

Tableau 28 : Comparaison des temps létaux des deux huiles essentielles

Temps létaux	<i>Ferula vesceritensis</i>	<i>Thymus mumbyanus</i>
TL_{50}	107.84 h = 107 h et 50 min	73.23 h = 73 h et 13 min
TL_{90}	198.85 h = 198 h et 51 min	100.15 h = 100 h et 9 min

Cette différence de toxicité est principalement due aux facteurs suivants :

- ✓ **Le stade végétatif de la plante :** en effet au moment où l'H.E. du thym a été extraite d'une plante adulte qui a achevé sa maturité et contient tous les composés de son métabolisme secondaire, celle de la fêrulle est obtenue d'une plante encore jeune.
- ✓ **La composition chimique des huiles essentielles :** nous avons identifié dans l'H.E. de la fêrulle 45.2 % de sesquiterpènes oxygénés et 28.8 % de sesquiterpènes alors que la teneur en monoterpènes ne dépasse pas 18 % (11.7 % de monoterpènes hydrocarbonés et 6 % de monoterpènes oxygénés). En revanche, dans l'H.E. du thym c'est les monoterpènes oxygénés qui prédominent avec une teneur de 66.6 %, suivis des monoterpènes non oxygénés (Meziane et Naimi, 2011). Selon Regnault-Roger (1995), c'est les monoterpènes oxygénés qui sont à l'origine des propriétés biologiques de la majorité des H.E.

La toxicité des huiles essentielles par la fumigation agit principalement sur le système nerveux central et l'appareil respiratoire de l'insecte où certains organes récepteurs subissent de très graves lésions ce qui leur cause une asphyxie se traduisant par la mort dans la plupart des cas. (Regnault-Roger 2008).

6 Etude comparative de l'effet antioxydant de l'H.E. de thymus munbyanus et des extraits non volatils de trois variétés de thym sur la stabilité oxydative de deux huiles alimentaires (soja et tournesol) au cours du stockage

Durant 45 jours de stockage dans des conditions extrêmes (température 50°C, présence de lumière et air) de deux huiles alimentaires; huile de soja et huile de tournesol auxquelles sont

ajoutées différentes concentrations de différents antioxydants à savoir l'huile essentielle de *T. munbyanus*, extrait phénolique de *T. algeriensis*, extrait phénolique de *T. pallescens* et BHT, on avait effectué des analyses renseignant sur le degré d'oxydation des huiles de soja et tournesol comme l'indice de peroxyde, indice d'iode chaque semaine, et le test de spectrophotométrie UV à 232 nm et à 270 nm chaque 15 jours.

1.1.1. Indice de peroxyde (IP)

L'indice de peroxyde est un paramètre qui renseigne sur l'état d'oxydation des huiles insaturées, la détermination de l'IP est basée sur l'oxydation des iodures en iode par l'oxygène actif de peroxyde. Il est mesuré pour tous les échantillons des huiles avant et tout au long de la durée de stockage. Les résultats des différentes séries (HE Tm, EP Tp, EP Ta, BHT, Témoin) sont représentés dans les tableaux 18 et 19 et les figures suivants 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 et 22.

a. Huile de tournesol

Tableau 29 : Indice de peroxyde (még d'O₂/Kg de corps gras) des échantillons d'huile de tournesol en fonction des différentes concentrations des extraits phénoliques et de l'huile essentielle et de la durée de stockage.

Tournesol	ppm	j0	j8	j15	j22	j30	j38	j45
HE Tm	100	3,5	62,5	141,5	190,5	205	278	547,5
	200	3,5	60	135	194,5	209	378	567,5
	400	3,5	56,5	132,5	194	201,5	294	357,5
	800	3,5	80,5	144	210,5	206,5	281	387,5
	1000	3,5	89,5	150,5	214,5	222	324	427,5
EP Tp	100	3,5	96,5	190	225	501,5	669	837,5
	200	3,5	94	179	211,5	493	652	812,5
	400	3,5	66,5	171	208,5	391,5	577	662,5
	800	3,5	84	160	230	394,5	590	787,5
	1000	3,5	74	184,5	239	337,5	582	827,5
EP Ta	100	3,5	81,5	153	191,5	274,5	345	417,5
	200	3,5	84	140,5	164	223	270	317,5
	400	3,5	69	135	160	205,5	246	287,5
	800	3,5	91,5	129,5	186,5	241,5	324	407,5
	1000	3,5	95	142	194,5	249,5	298	347,5
BHT	400	3,5	60	101,5	171,5	151,5	254	357,5
	1000	3,5	26	63,5	129	111,5	215	320
Témoin	témoin	3,5	99	174	289,5	329	400	472,5

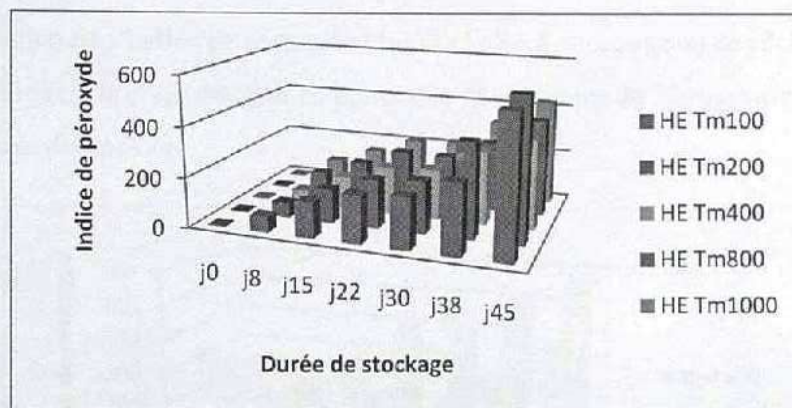


Figure 35: Evolution de l'indice de peroxyde (méqd'O₂/Kg de corps gras) des échantillons de tournesol en fonction de la concentration en huile essentielle du *Thymus munbyanus* et en fonction de la durée de stockage.

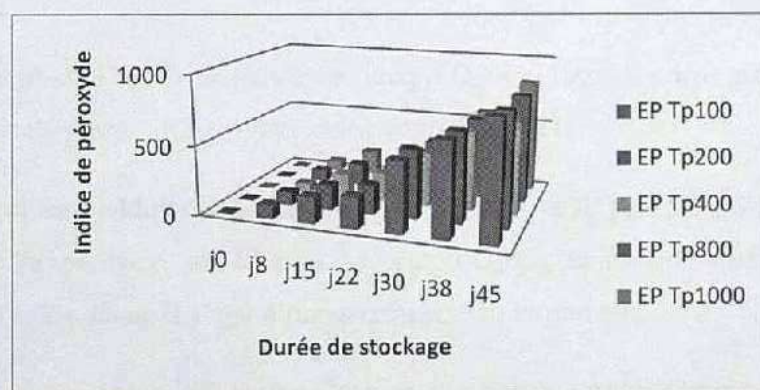


Figure 36: Evolution de l'indice de peroxyde (méqd'O₂/Kg de corps gras) des échantillons de tournesol en fonction de la concentration en composés phénoliques du *Thymus pallescens* et en fonction de la durée de stockage.

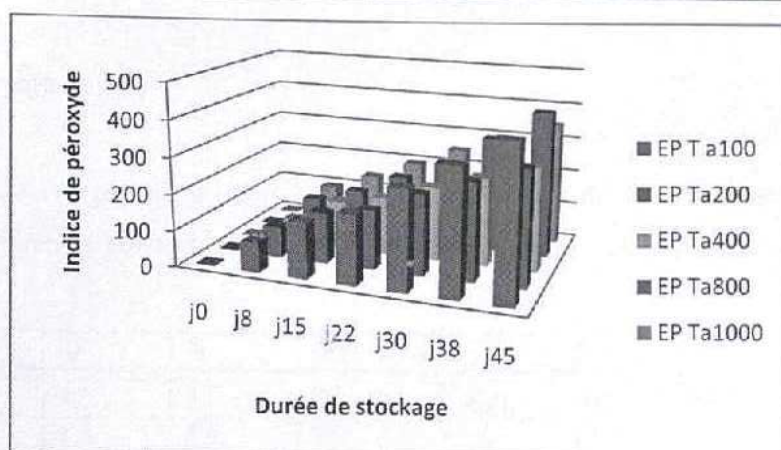


Figure 37 : Evolution de l'indice de peroxyde (mégd'O₂/Kg de corps gras) des échantillons de tournesol en fonction de la concentration en composés phénoliques du *Thymus algeriensis* et en fonction de la durée de stockage.

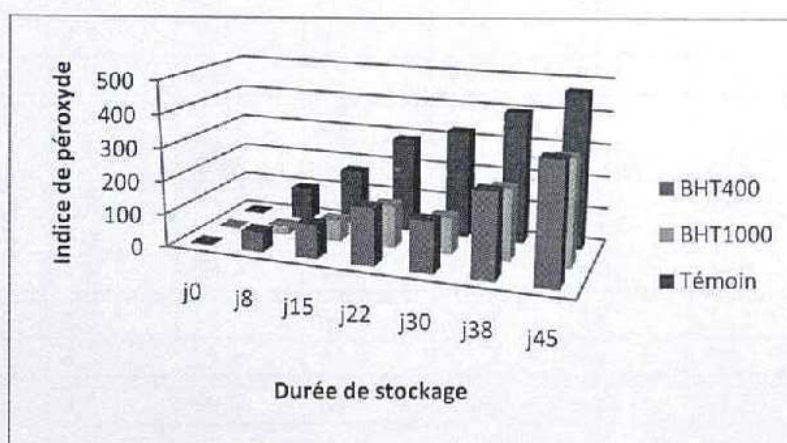


Figure 38 : Evolution de l'indice de peroxyde (mégd'O₂/Kg /100g de corps gras) du témoin et des échantillons d'huile de tournesol aux quels sont rajoutés du BHT.

L'huile de tournesol sans additifs (témoin) présente le plus haut IP parmi les différents traitements. Au temps zéro de l'expérience, son IP était 3,5 mégd'O₂/Kg, tandis que après 45jours il devient égal à 472 mégd'O₂/Kg. Donc il s'agit d'une augmentation importante

L'IP relatif aux séries contenant des antioxydants évolue dans un rythme moins accentué que celui du témoin. D'ailleurs l'effet antioxydant des différents additifs dans l'huile de tournesol suit significativement l'ordre suivant : EP Ta400ppm>HE Tm400ppm>EP Tp400ppm.

Il est à signaler que le BHT est plus efficace que les autres additifs naturels, qui reste un antioxydant de synthèse qui a ses inconvénients.

b. Huile de soja

Tableau 30 : Indice de peroxyde (még d'O₂/Kg de corps gras) des échantillons d'huile de soja en fonction des différentes concentrations des extraits phénoliques et de l'huile essentielle et de la durée de stockage

Soja	ppm	j0	j8	j15	j22	j30	j38	j45
HE Tm	100	4,5	25	70,5	101,5	167,5	205	231,5
	200	4,5	22	86	154	187,5	212	236,5
	400	4,5	61	101,5	169,5	176,5	204	244
	800	4,5	47,5	134	181	210	242	274
	1000	4,5	70,5	122,5	181,5	210	237	264
EP Tp	100	4,5	55	68	136,5	194	261,5	329
	200	4,5	46,5	94,5	202	286,5	355	424
	400	4,5	48	108,5	224	325	392	459
	800	4,5	47	94	192	275	319	364
	1000	4,5	43	81	177,5	319	421	524
EP Ta	100	4,5	46	56	90,5	154	209	264
	200	4,5	43,7	62,5	79	138,5	176	214
	400	4,5	46,5	69	130	164	204	244
	800	4,5	51,5	74	105	139	177	216,5
	1000	4,5	79	114	154	189	214	239
BHT	400	4,5	33	66,5	70,5	74	112	151,5
	1000	4,5	25,5	43,5	61,5	69	95	121,5
Témoin	témoin	4,5	50,5	74	146,5	196	207	349

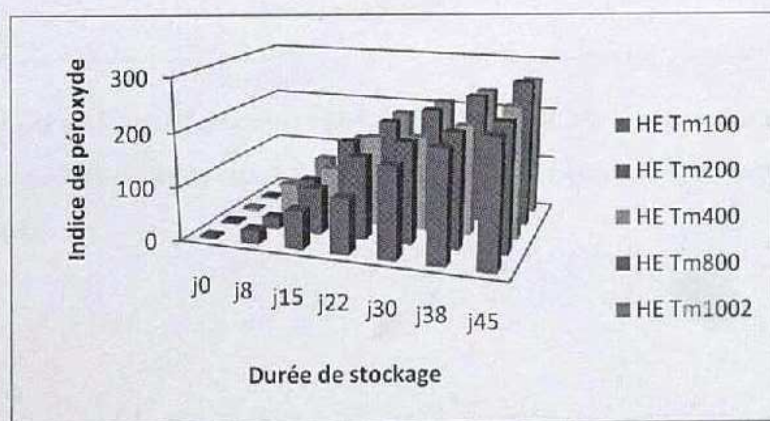


Figure39 : Evolution de l'indice de peroxyde (méqd'O₂/Kg de corps gras) des échantillons de soja en fonction de la concentration en huile essentielle du *Thymus munbyanus* et en fonction de la durée de stockage.

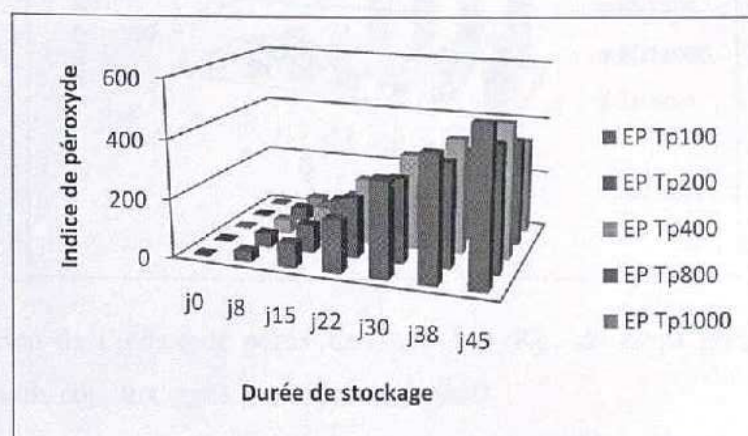


Figure40 : Evolution de l'indice de peroxyde (méqd'O₂/Kg de corps gras) des échantillons d'huile de soja en fonction de la concentration en extrait phénolique du *Thymus pallescens* et en fonction de la durée de stockage.

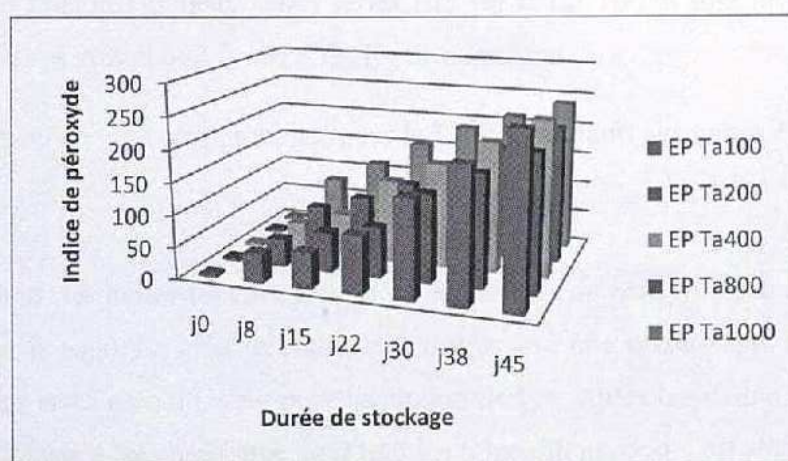


Figure41 : Evolution de l'indice de peroxyde (méqd'O₂/Kg de corps gras) des échantillons de soja en fonction de la concentration en composés phénoliques du *Thymus algeriensis* et en fonction de la durée de stockage.

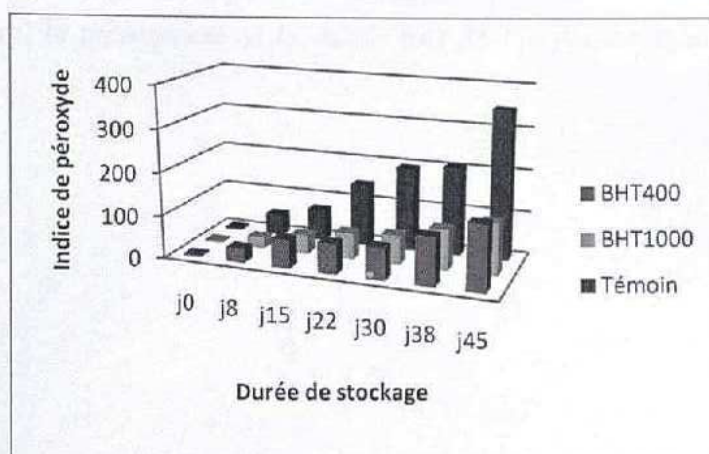


Figure42 : Evolution de l'indice de peroxyde (még d'O₂/Kg de corps gras) du témoin et des échantillons d'huile de soja aux quels sont rajoutés du BHT

L'évolution de l'IP des séries contenant des antioxydants suit relativement un rythme moins accentué que celle du témoin.

L'IP le plus faible est enregistré au niveau de la série EP Ta avec une valeur de 214 még d'O₂/Kg de corps gras, par rapport aux deux autres séries HE Tm et EP Tp qui sont respectivement 357,5 még d'O₂/Kg de corps gras et 662,5 még d'O₂/Kg de corps gras.

Les résultats révèlent un effet plus prononcé pour le BHT par rapport aux autres concentrations.

Interprétation :

D'après les résultats, les huiles fraîches présentent des indices de peroxyde peu élevés (3,5 pour le tournesol, 4,5 pour le soja). En effet, le codex alimentarius fixe une valeur de 10 még d'O₂/Kg pour les huiles raffinées et 15 még d'O₂/Kg pour les huiles vierges. Après oxydation, une augmentation de l'indice de peroxyde a été enregistrée pour tous les échantillons, ce qui est attribué à la formation des peroxydes au cours de chauffage des huiles. L'augmentation de l'IP est due à la formation de peroxydes formés par oxydation, puis évoluant ensuite vers des structures secondaires : produits volatils et non volatils (Perrin, 1992)

L'augmentation de l'IP de l'huile de soja est plus faible que celui de l'huile de tournesol.

L'oxydation rapide de l'huile de tournesol est attendue pour sa pauvreté en antioxydants naturels contrairement à l'huile de soja brute.

L'ajout d'antioxydant naturel (polyphénols et huile essentielle) et synthétique diminuent la vitesse de l'oxydation naturelle. Les antioxydants phénoliques cèdent des atomes d'hydrogène aux radicaux

libres et arrêtent ainsi la propagation de la chaîne lors de l'oxydation lipidique (Ranalli *et al.*, 2003).

1.1.2. Indice d'iode (II)

Tableau 31: Indice d'iode (g I₂ fixé / 100 g de corps gras) des échantillons d'huile de tournesol en fonction des différentes concentrations des extraits phénoliques et de l'huile essentielle et de la durée de stockage

tournesol	ppm	j0	j8	j15	j22	j30	j38	j45
HTm	100	106,4	75,31	72,96	67,25	61,62	59,15	59,70
	200	106,4	78,92	76,14	68,52	63,01	61,09	60,11
	400	106,4	77,65	75,50	66,62	62,44	61,80	60,50
	800	106,4	77,02	71,06	63,45	60,17	59,75	58,80
	1000	106,4	73,85	70,01	63,39	58,89	58,10	58,10
EPTp	100	106,4	73,90	69,18	66,77	64,11	60,17	57,78
	200	106,4	74,54	70,96	69,32	65,15	61,00	57,95
	400	106,4	75,80	69,38	67,40	65,67	61,05	58,01
	800	106,4	71,32	68,75	66,50	65,02	60,11	57,56
	1000	106,4	67,56	67,42	63,96	64,98	59,65	57,34
EPTa	100	106,4	69,80	68,57	65,60	63,67	61,50	57,10
	200	106,4	69,98	68,80	65,79	63,60	61,56	57,15
	400	106,4	69,76	68,76	65,84	63,58	61,55	57,12
	800	106,4	68,90	68,50	65,82	63,57	61,54	57,14
	1000	106,4	67,15	68,42	65,50	63,40	61,53	57,11
BHT	400	106,4	77,11	69,16	67,48	64,30	60,11	57,08
	1000	106,4	75,80	66,54	65,56	63,18	59,55	56,76
Témoin	témoin	106,4	68,55	66,40	62,34	62,56	60,02	57,50

L'indice d'iode indique le degré d'insaturation des huiles (karelskind, 1992). Il renseigne sur l'état d'oxydation. Les valeurs de l'indice d'iode des huiles étudiées en fonction des concentrations des extraits phénoliques et de l'huile essentielle rapportées par les tableaux 20, 21 et les figures 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 et 30.

a. Huile de tournesol

Tableau n°20 : Indice d'iode (g I₂ fixé / 100 g de corps gras) des échantillons d'huile de tournesol en fonction des différentes concentrations des extraits phénoliques et de l'huile essentielle et de la durée de stockage

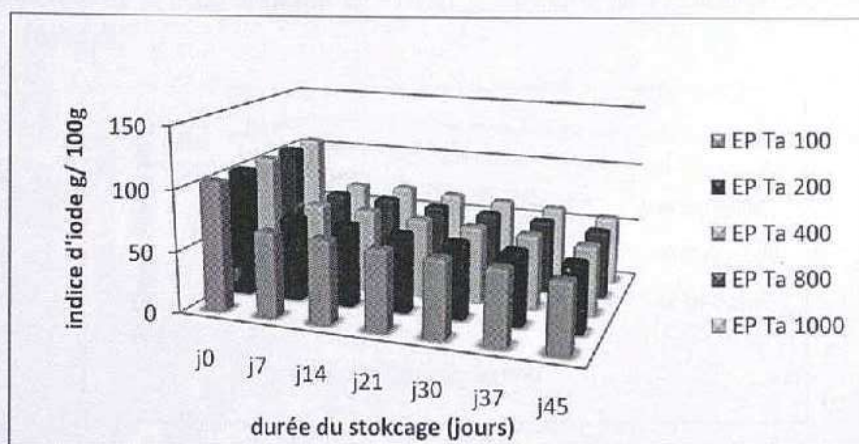


Figure 43 : Evolution de l'indice d'iode (g I₂ / 100g de corps gras) des échantillons d'huile de tournesol en fonction de la concentration en extrait phénolique du *Thymus algeriensis* et en fonction de la durée de stockage.

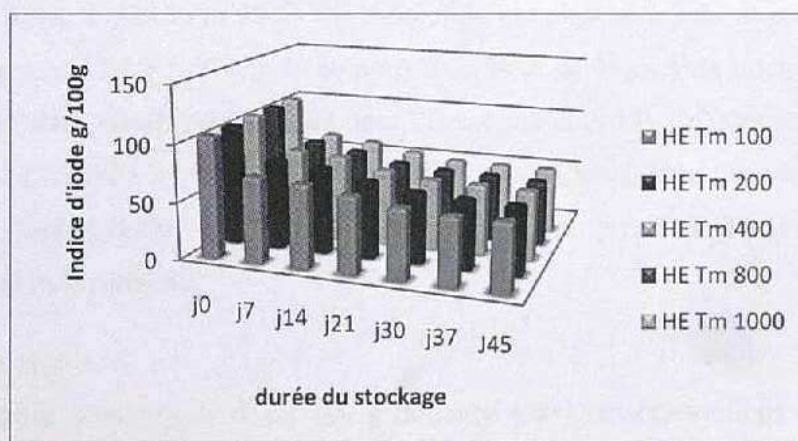


Figure 44 : Evolution de l'indice d'iode (g I₂ / 100g de corps gras) des échantillons d'huile de tournesol en fonction de la concentration en huile essentielle du *Thymus munbyanus* et en fonction de la durée de stockage.

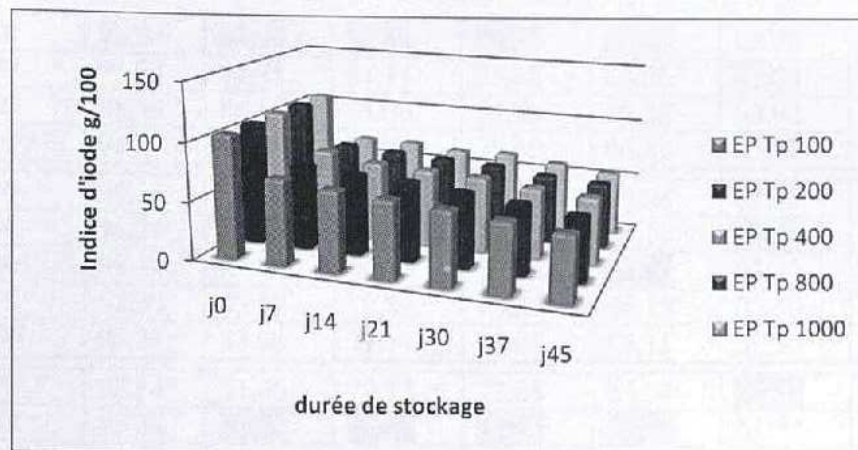


Figure45 : Evolution de l'indice d'iode ($\text{g I}_2/100\text{g}$ de corps gras) des échantillons d'huile de tournesol en fonction de la concentration en extrait phénolique du *Thymus palleescens* et en fonction de la durée de stockage.

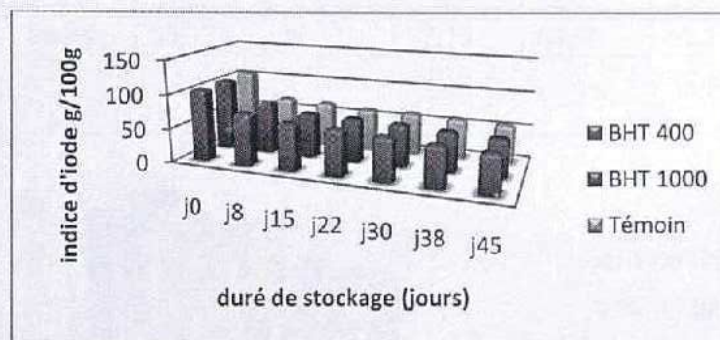


Figure46 : Evolution de l'indice d'iode ($\text{g I}_2/100\text{g}$ de corps gras) du témoin et des échantillons d'huile de tournesol aux quels sont rajoutés du BHT.

D'après les résultats obtenus, nous observons une diminution de cet indice pour les différentes concentrations. Ainsi la réduction de d' l'II du témoin est plus accentuée il passe de $106,4 \text{ g I}_2/100\text{g}$ de corps gras à $57,6 \text{ g I}_2/100\text{g}$ de corps gras au bout de 45jours de stockage. L'II révèle un effet antioxydant dans l'huile de tournesol dans l'ordre suivant : EP Ta200ppm > EP Tp200ppm > HE Tm200ppm. L'activité antioxydante du BHT est assez semblable que celle des différentes concentrations d'antioxydants naturels. Il y-a aussi à signaler que le BHT est un antioxydant de synthèse qui a ses inconvénients.

b. Huile de soja

Tableau 32 : Indice d'iode (g I_2 fixé / 100 g de corps gras) des échantillons d'huile de soja en fonction des différentes concentrations des extraits phénoliques et de l'huile essentielle et de la durée de stockage

Soja	ppm	j0	j8	j15	j22	j30	j38	j45
	100	98,34	84,92	81,21	75,62	66,11	63,66	61,34

HTm	200	98,34	84,99	81,48	75,80	66,43	63,78	61,57
	400	98,34	84,75	81,11	75,68	66,36	63,89	61,55
	800	98,34	84,60	81,09	75,66	66,38	63,92	61,52
	1000	98,34	84,22	80,77	75,60	66,41	63,91	61,49
EPTp	100	98,34	83,93	80,80	73,13	65,04	62,45	60,66
	200	98,34	83,91	81,01	73,43	65,19	62,47	60,69
	400	98,34	83,70	80,16	73,39	65,24	62,42	60,67
	800	98,34	83,69	79,86	73,25	65,15	62,40	60,65
	1000	98,34	83,66	77,11	73,01	65,11	62,33	60,63
EPTa	100	98,34	81,66	79,13	72,88	64,34	61,59	59,80
	200	98,34	81,72	79,45	72,92	64,39	61,57	59,89
	400	98,34	81,71	79,44	72,80	64,33	61,53	59,77
	800	98,34	81,70	79,40	72,76	64,32	61,48	59,76
	1000	98,34	81,61	78,29	72,55	64,29	61,43	59,74
BHT	400	98,34	86,68	82,19	73,66	64,78	64,14	60,16
	1000	98,34	88,89	84,44	78,12	67,99	67,22	64,11
Témoin	témoin	98,34	83,77	79,33	72,73	64,35	62,33	59,66

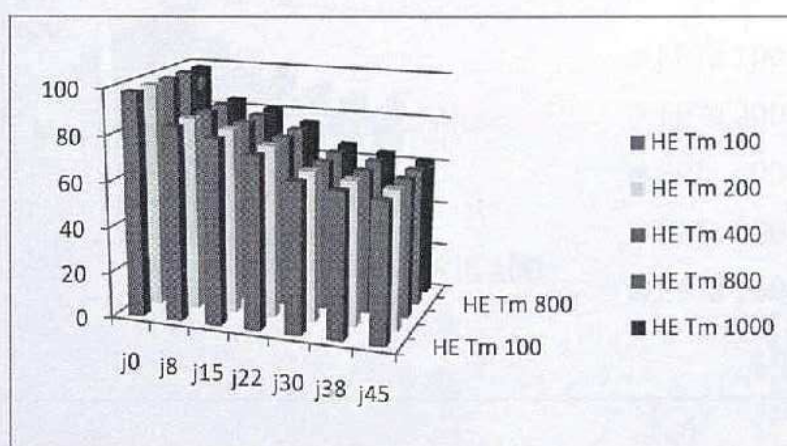


Figure47 : Evolution de l'indice d'iode ($\text{g I}_2/100\text{g}$ de corps gras) des échantillons d'huile de soja en fonction de la concentration en huile essentielle du *Thymus munbyanus* et en fonction de la durée de stockage.

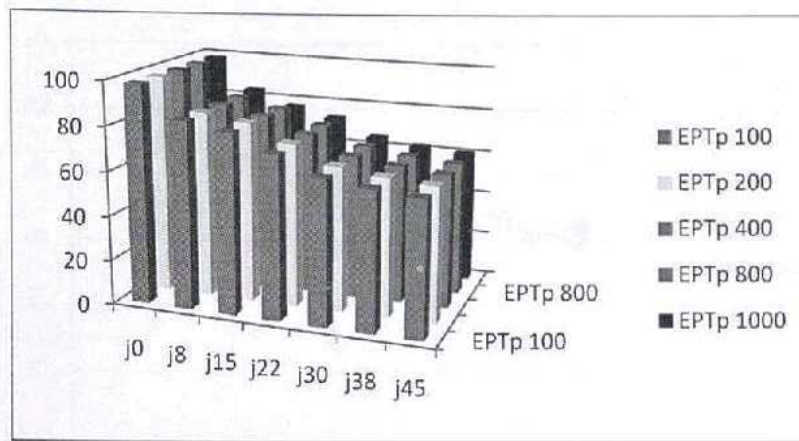


Figure 48 : Evolution de l'indice d'iode ($\text{g I}_2/100\text{g}$ de corps gras) des échantillons d'huile de soja en fonction de la concentration en extraits phénoliques du *Thymus pallescens* et en fonction de la durée de stockage.

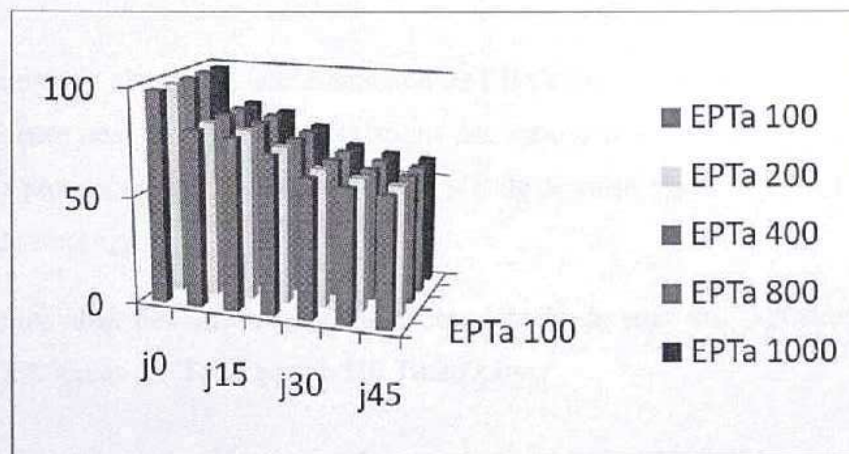


Figure 49 : Evolution de l'indice d'iode ($\text{g I}_2/100\text{g}$ de corps gras) des échantillons d'huile de soja en fonction de la concentration en extraits phénoliques du *Thymus algeriensis* et en fonction de la durée de stockage.

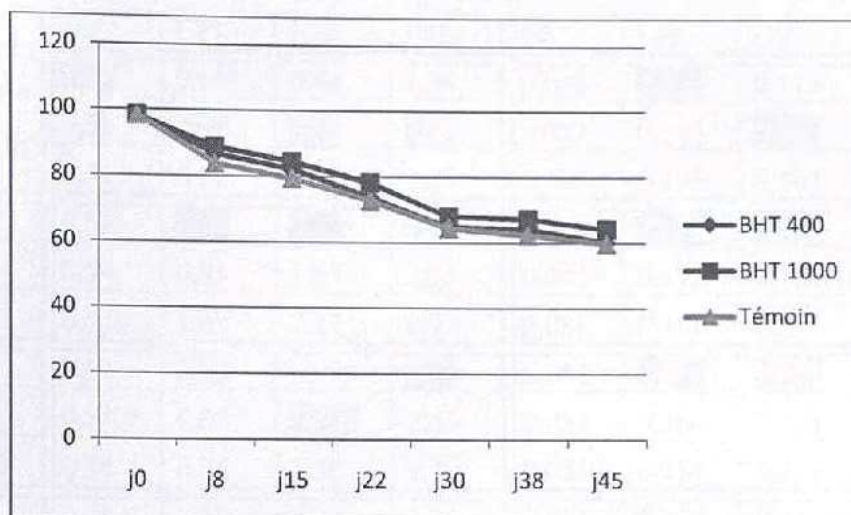


Figure n°30: Evolution de l'indice d'iode ($\text{g I}_2/100\text{g}$ de corps gras) du témoin et des échantillons d'huile de tournesol aux quels sont rajoutés du BHT.

Les résultats montrent clairement une diminution de l'II de l'huile de soja au court du temps, cela est mis en évidence pour toutes les concentrations des antioxydants. Ainsi l'abaissement de l'II du témoin est plus prononcée, elle passe de $98,34 \text{ g I}_2/100\text{g}$ de corps gras à $59,66 \text{ g I}_2/100\text{g}$ de corps gras au court du stockage.

Le pouvoir antioxydant des différents additifs dans l'huile de soja suit significativement l'ordre suivant : EP Ta200ppm > EP Tp200ppm > HE Tm200ppm.

L'effet antioxydant du BHT est comparable à celui des antioxydants naturels.

Interprétation :

C'est une application analytique de la fixation d'halogènes sur la double liaison. Cette diminution de l'indice d'iode est liée à la perte des liaisons éthyléniques des acides gras insaturés pendant le processus d'oxydation.

Plus l'II d'un corps gras est élevé plus sa teneur en acides gras insaturés est grandes (Alais & Linden, 2008).

C'est une notion ancienne qui a résisté à l'évolution des méthodes.

		j 0	j 15	j 30	j 45	j 0	j 15	j 30	j 45
HE Tm	100	0,54	0,66	0,84	1,94	0,081	0,112	0,113	0,128
	400	0,54	0,58	0,77	1,19	0,081	0,118	0,110	0,120
	1000	0,54	0,98	0,84	2,27	0,081	0,125	0,187	0,233
EP Tp	100	0,54	0,71	1,11	2,38	0,081	0,158	0,237	0,233
	400	0,54	0,81	1,65	2,65	0,081	0,173	0,275	0,306
	1000	0,54	1,09	2,17	2,92	0,081	0,187	0,252	0,361
EP Ta	100	0,54	0,73	0,926	2,33	0,081	0,153	0,115	0,591
	400	0,54	0,80	0,841	2,65	0,081	0,160	0,218	0,640
	1000	0,54	0,85	1,38	2,70	0,081	0,181	0,241	0,815
BHT	400	0,54	0,57	1,45	2,36	0,081	0,176	0,258	0,277
	1000	0,54	0,48	1,23	2,15	0,081	0,159	0,231	0,237
Témoin		0,54	0,88	2,28	2,39	0,081	0,177	0,215	0,600

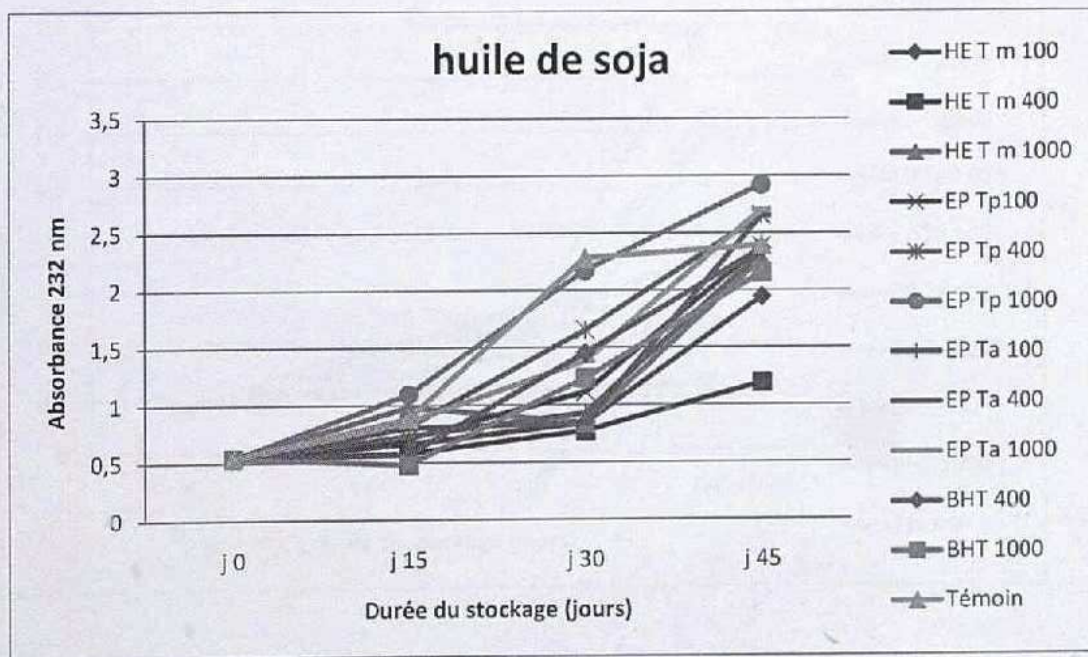


Figure n°31 : absorbance à 232 nm des échantillons d'huile de soja au cours du stockage en fonction des antioxydants apportés en différentes concentrations

Les valeurs consignées dans le tableau 21, et illustrées dans la figure 31, montrent que les absorbances à 232 nm de tous les échantillons ont tendance à augmenter durant le temps renseignant sur le degré de peroxydation de l'huile de soja, ces valeurs varient de 0,54 à 2,92.

D'après la figure 31, les densités optiques à 232 nm obtenues pour les échantillons d'huile de soja auxquels sont additionnés les différentes concentrations en extraits phénoliques, huile essentielle et BHT augmentent, et cette augmentation est remarquée légère pour les échantillons auxquels sont rajoutées des concentrations en huile essentielle de *T. munbyanus*, et sont plus prononcées pour les échantillons d'huile de soja témoin et ceux avec extrait phénolique de *T. algeriensis*.

Les concentrations des différents antioxydants qui semblent protéger mieux l'huile de soja sont, pour l'huile essentielle de *T. munbyanus* 400 ppm, pour l'extrait phénolique de *T. algeriensis* 100 ppm. Pour l'extrait phénolique de *T. pallescens* 100 ppm. Les échantillons au BHT semblent mieux conservés que ceux avec l'extrait phénolique de *T. pallescens*, mais moins par rapport aux autres.

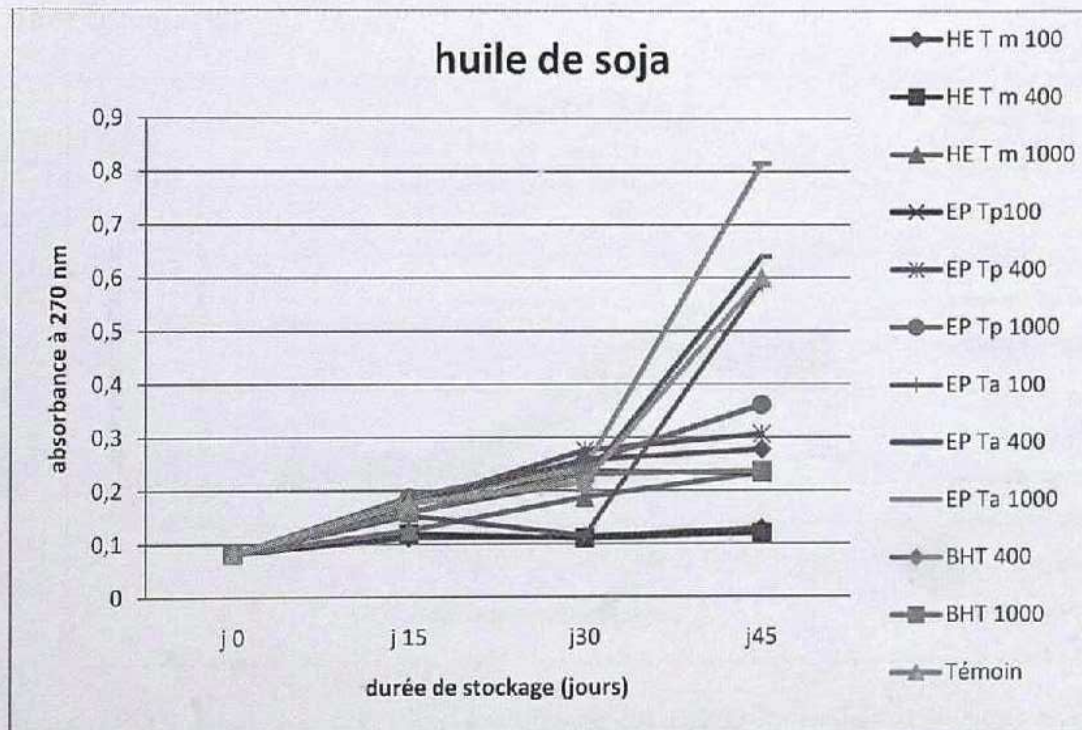


Figure n°32 : absorbance à 270 nm des échantillons d'huile de soja au cours du stockage en fonction des antioxydants apportés en différentes concentrations.

Les résultats pour les densités optiques à 270 nm des différents échantillons augmentent d'une façon progressive en fonction du temps indiquant la formation des composés secondaires d'oxydation.

Les valeurs des absorbances à 270 nm obtenues pour les différents échantillons de l'huile de soja varient entre 0,081 et 0,815. Ces valeurs aperçues sont plus faibles pour les échantillons avec huile essentielle de *T. munbyanus* avec une concentration de 400 ppm, suivies par les échantillons avec BHT, puis ceux avec extrait phénolique de *T. pallescens* à une concentration de 400 ppm, et les valeurs les plus grandes sont enregistrées pour l'échantillon témoin de l'huile de soja seule et pour les échantillons de *T. algeriensis*.

Pour ce type d'analyse par spectrophotométrie UV, on peut dire que l'huile de soja est mieux conservée avec l'huile essentielle de *T. munbyanus*, puis avec l'extrait phénolique de *T. algeriensis*, vient en dernier l'extrait phénolique de *T. pallescens*, le BHT même s'il protège mieux que ces deux derniers extraits phénoliques reste un antioxydant de synthèse à éliminer d'une alimentation plus saine.

Huile de tournesol

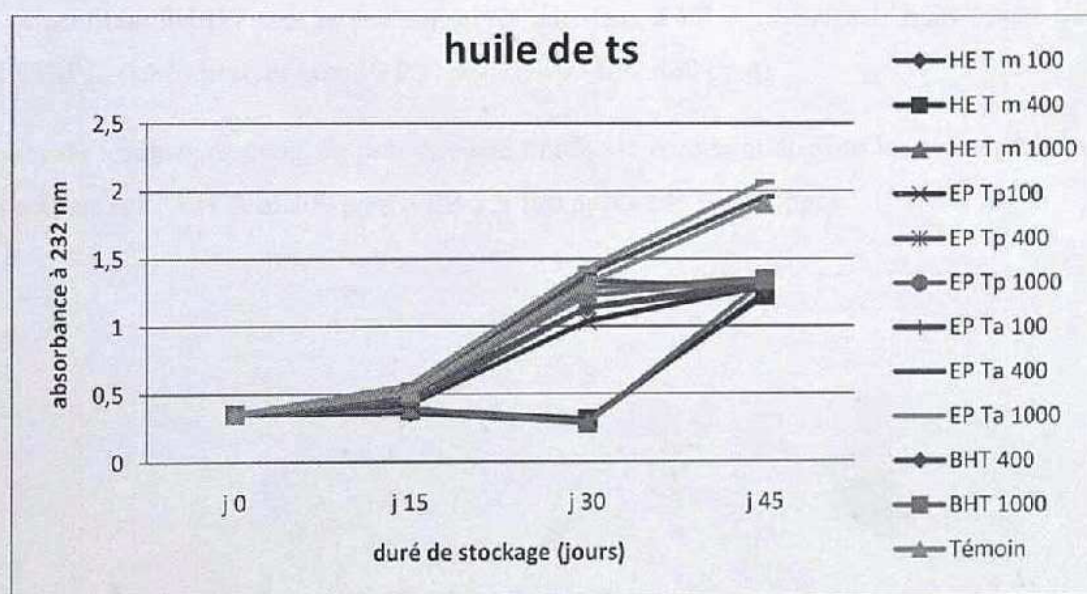


Figure n°33 : absorbance à 232 nm des échantillons d'huile de tournesol au cours du stockage en fonction des antioxydants apportés en différentes concentrations.

EP Tp	400	0,352	0,440	1,140	1,329	0,115	0,196	0,176	0,230
	1000	0,352	0,481	1,28	1,348	0,115	0,215	0,290	0,303
EP Ta	100	0,352	0,525	1,340	1,281	0,115	0,183	0,216	0,392
	400	0,352	0,518	1,387	1,956	0,115	0,234	0,166	0,381
	1000	0,352	0,564	1,424	2,065	0,115	0,164	0,284	0,411
BHT	400	0,352	0,509	1,228	1,345	0,115	0,205	0,132	0,212
	1000	0,352	0,499	1,138	1,290	0,115	0,184	0,129	0,234
Témoin		0,352	0,515	1,315	1,905	0,115	0,201	0,280	0,292

D'après les résultats représentés dans le tableau 22 et la figure 33, on remarque que l'absorbance des différents échantillons de l'huile de tournesol à 232 nm augmente d'une façon progressive au bout des 45 jours de stockage à 50°C, elle varie de 0,352 et 2,065 qui semblent inférieures à celles obtenues pour l'huile de soja.

L'huile de tournesol témoin contient le plus de composés hydroperoxyde que les autres échantillons à l'exception de ceux avec *T. algeriensis* aux concentrations de 400 ppm et 1000 ppm, les valeurs les plus faibles de la densité optique à 232 nm sont enregistrées pour les échantillons à huile essentielle avec une concentration de 1000 ppm, suivies par celles obtenues pour les échantillons de l'EP *T. pallescens* (100,400 ppm), et puis celles des échantillons avec EP *T. algeriensis* (100 ppm).

Les échantillons à BHT sont mieux conservés que ceux à EP *T. algeriensis* mais moins que ceux avec l'HE *T. munbyanus*, et avec l'EP *T. pallescens* (100, 400 ppm).

D'après les résultats obtenus, on peut dire que l'ordre de conservation pour les antioxydants utilisés était comme suit : EH T. m 400 ppm > EP T.p 100 ppm > EP T.a 100ppm.

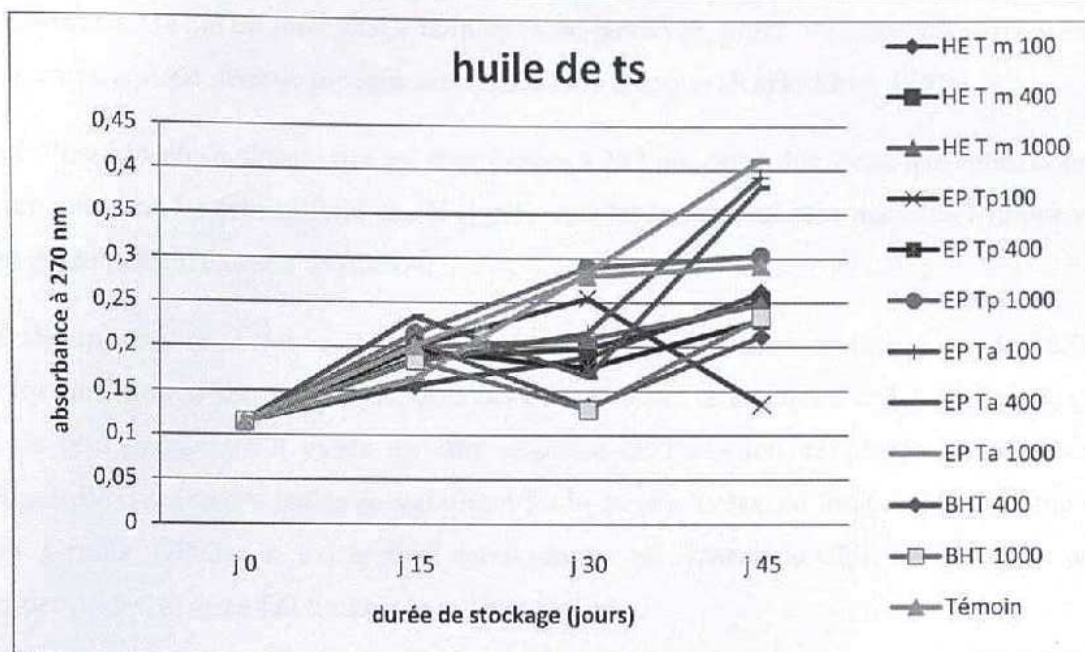


Figure n°34 : absorbance à 270 nm des échantillons d'huile de tournesol au cours du stockage en fonction des antioxydants apportés en différentes concentrations.

Les valeurs de la densité optique à 270 nm au durant les 45 jours de stockage oscillent entre 0,115 et 0,411 qui sont plus faibles que celles de l'huile de soja.

Les résultats de l'absorbance à 270 nm des différents échantillons d'huile de tournesol représentés par la figure 34 indiquent que les taux de composés secondaires d'oxydation de cette huile les plus faibles sont obtenus pour les échantillons additionnés de l'EP T p (100 ppm).

Interprétation :

Les produits primaires d'oxydation des graisses et des huiles sont des intermédiaires de transition qui se décomposent en divers produits secondaires. La mesure des produits secondaires d'oxydation en tant qu'indices d'oxydation des lipides est plus appropriée à partir du moment où les produits secondaires d'oxydation sont « odeurs-actif », tandis que les produits primaires d'oxydation sont moins colorés et odorés (Akoh, Min, 2008).

La peroxydation des acides gras insaturés provoque la conjugaison des doubles liaisons, et la formation des diènes conjugués relativement stables, qui peuvent être mesurés en spectrophotométrie à 232 nm. Les produits secondaires d'oxydation et en particulier des α -dicétones et α -insaturés présentent un maximum d'absorption vers 270 nm. Par conséquent, plus

l'absorbance à 232 nm est forte plus le corps gras est peroxydé, plus l'absorbance à 270 nm est forte plus le corps gras est riche en produits secondaires d'oxydation (Karleskind, 1992).

Les résultats obtenus indiquent que les absorbances à 232 nm sont plus fortes que celles obtenues à 270 nm pour tous les échantillons, ce qui signifie que les huiles sont plus riches en hydroperoxydes qu'en produits secondaires d'oxydation.

Les absorbances mesurées à 232 nm et à 270 nm des huiles additionnées des différents antioxydants naturels sont pour la majorité des échantillons, inférieures à celles des témoins. De ce fait, on peut déduire qu'il existe un effet résultant de l'addition des différents extraits sur la cinétique d'oxydation des huiles en stabilisant les hydroperoxydes, en limitant leur décomposition. Selon Graille (2003), il existe des antioxydants qui jouent le rôle de stabilisateurs des hydroperoxydes, et de ce fait limitent leur décomposition.

Les résultats obtenus par les différentes analyses sur les deux huiles auxquelles sont rajoutés les différents extraits comme antioxydant montrent une différence de protection des différents antioxydants en différentes concentration, le tableau suivant résume les ordres de protection des deux huiles par les différents tests.

Tableau 35: tableau récapitulatif de l'ordre de protection des huiles au cours de stockage par les différents antioxydants naturels utilisés

Huiles	Huile de soja	Huile de tournesol
Tests		
Indice de peroxyde	Ta 200 > HE 100 > Tp 100	Ta 400 > HE 400 > Tp 100
Indice d'iode	Ta 200 > Tp 200 > HE 200	Ta 200 > Tp 400 > HE 200
Spectroscopie UV	HE 400 > Ta 100 > Tp 100	HE 400 > Ta 100 > Tp 100
En conclusion	Ta 200 > HE 400 > Tp 100	Ta 200 > HE 400 > Tp 100

D'après le tableau ci-dessus, l'extrait phénolique de *T. algeriensis* à une concentration de 200 ppm protège mieux les huiles de soja et de tournesol, suivi de l'huile essentielle de *T. munbyanus* à 400 ppm contre 100 ppm de *T. pallezensis*.

Cette différence d'ordre de protection des différents antioxydants d'un test à un autre peut être due aux différentes conditions de manipulation, aux différents réactifs pour chaque test, et la différence entre l'huile de soja et celle de tournesol peut être liée au profil en acide gras de ces dernières.

Tableau 36: composition en acide gras de l'huile de soja avant et après oxydation à 50 °C pendant 45 jours

Acides gras de l'huile de soja	% en acide gras avant oxydation	% en acide gras après oxydation du témoin
C16 : 0	12,31	10,91
C18 : 0	3,47	3,75
C18 : 1	22,97	22,96
C18 : 2	53,78	55,61
C18 : 3	7,47	6,76

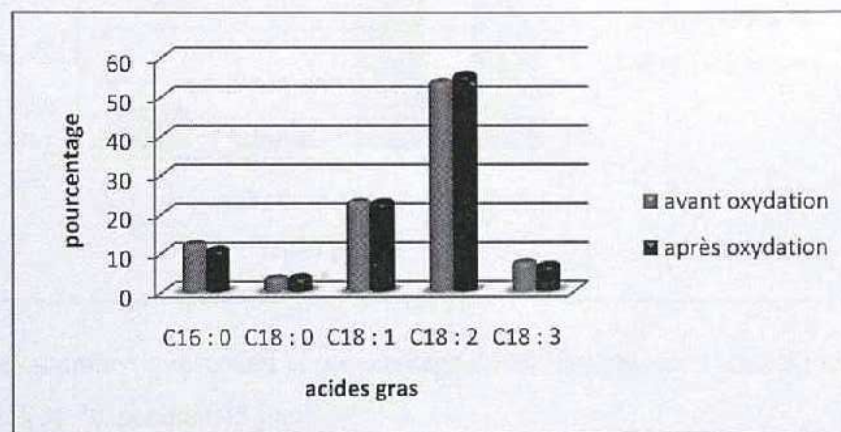


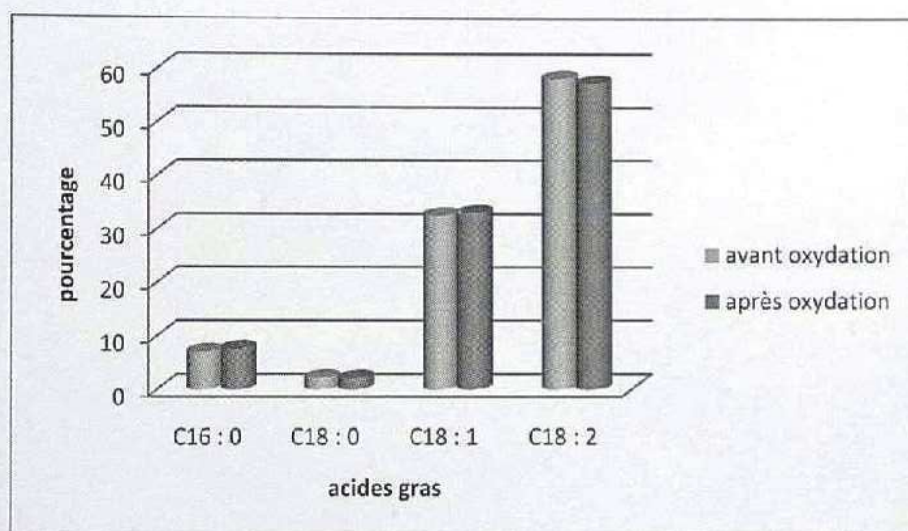
Figure n°35 : histogramme représentant le pourcentage des acides gras de l'huile de soja avant et après oxydation à 50 °C pendant 45 jours.

On remarque que l'acide gras à deux insaturations représente la part la plus importante de l'huile de soja à 53,78 %, celui à trois insaturations renferme 7,47%.

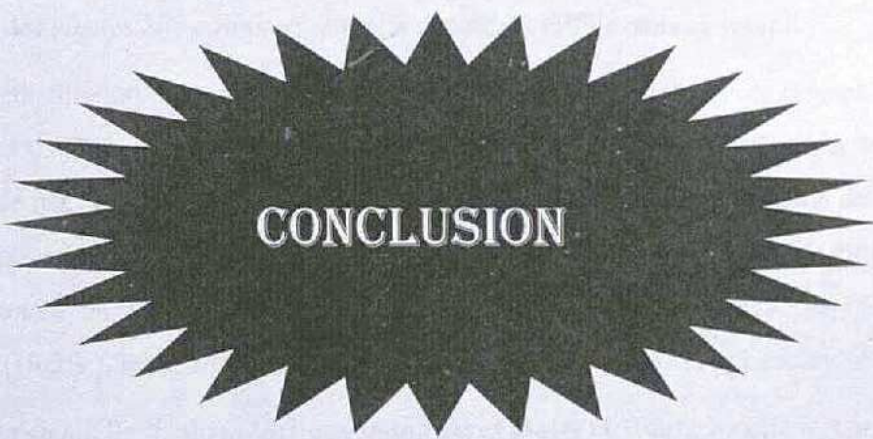
Après oxydation, on remarque une diminution du pourcentage de l'acide gras à trois insaturations, et en parallèle une légère augmentation de celui à deux insaturations qui peut être expliqué par le fait que l'oxydation attaque en premier les acides gras à trois insaturations en les transformant en acides gras à deux insaturations.

Tableau 37 : composition en acide gras de l'huile de tournesol avant et après oxydation à 50 °C pendant 45 jours

Acides gras de l'huile de tournesol	% en acide gras avant oxydation	% en acide gras après oxydation du témoin
C16 : 0	7,04	7,61
C18 : 0	2,17	2,08
C18 : 1	32,53	32,98
C18 : 2	58,26	57,33

**Figure n°36** : histogramme représentant le pourcentage des acides gras de l'huile de tournesol avant et après oxydation à 50 °C pendant 45 jours.

On constate d'après les résultats représentés par le tableau et le graphe que le pourcentage en acide gras bi-insaturé a diminué légèrement de 58,26 à 57,33 après l'oxydation, tandis qu'une faible augmentation en pourcentage de l'acide mono-insaturé et de l'acide saturé est remarquée.



CONCLUSION

Les Travaux sur la valorisation de la flore algérienne restent encore embryonnaires et assez limitées, vu le nombre considérable d'espèces botaniques poussant en Algérie, particulièrement les espèces endémiques qui constituent un patrimoine propre à notre pays et qu'il faut sauvegarder et préserver.

C'est dans cette perspective que s'inscrit notre travail portant sur l'étude de trois espèces de plantes aromatiques ; deux d'entre elles sont endémiques, il s'agit de la Férule (*ferula vesceritensis* Coss. et Dur.) et du thym (*thymus munbyanus* Desf.), la 3^{ème} plante étant originaire de l'amérique du sud et qui s'est naturalisée dans le bassin méditerranéen il s'agit de l'épazote (*Dysphania ambrosioides* L.).

Dans un premier temps, nous avons étudié la composition chimique des constituants organiques volatils, à travers les huiles essentielles extraites par hydrodistillation des parties aériennes des plantes. 209 composés au total ont été identifiés dans ce travail.

➤ L'hydrodistillation de la partie aérienne séchée et broyée de l'épazote (*Dysphania ambrosioides* L.) fournit 0.8% d'une huile essentielle jaune orangée, devenant brunâtre par le vieillissement et caractérisée par une odeur fortement désagréable, ayant un indice de réfraction de 1.1520 (à 20°C) et une densité relative $d_{20}^{20} = 0.8890$. 23 composés organiques volatils constituant 96.3% de la quantité totale de l'huile essentielle ont été identifiés. Les composés majoritaires sont : L' α -terpinene (18.3%), le para-cymene (26.4%), le terpinolene (27.1%) et l'ascaridole (23.3%).

➤ L'huile essentielle du thym (*thymus munbyanus* Boiss et Reut.) récolté à Azazga dans la wilaya de Tizi Ouzou a été analysée. 92 composés ont été identifiés correspondant à 93% de la composition totale de l'huile. Le para-cymene (5.1%) et le γ -terpinene (7.0%) assurent une note de tête boisée, l' α -terpineol (7.6%), le thymol (18.5%) et le carvacrol (35.2%) assurent une note de cœur thymolée-camphrée.

➤ Les huiles essentielles de l'espèce de férule (*ferula vesceritensis* Coss. et Dur.) récoltée dans la région de Daya Ben Dahoua dans la wilaya de Ghardaïa, obtenue à partir de l'hydrodistillation des parties aériennes séchées et broyées de la plante à 2 stades végétatifs différents (plante au stade jeune récoltée en décembre 2010 et plante adulte récoltée en période de floraison en juin 2011) ont été étudiées et caractérisées pour la 1^{ère} fois. Les huiles extraites diffèrent peu du point de vue sensoriel et organoleptique, celle extraite à partir des feuilles de la plante juvénile a l'aspect d'un

liquide mobile de couleur jaune verdâtre, celle extraite à partir des feuilles de la plante adulte se présente sous l'aspect d'un liquide mobile lipide de couleur jaune claire avec une odeur épicée. 93 composés organiques ont été identifiés dans l'ensemble des huiles essentielles de la plante, dont 50 se retrouvent dans les deux huiles.

① 69 composés ont été identifiés dans l'H.E. des feuilles de la jeune plante correspondant à 92.2% de la composition chimique totale de cette huile essentielle. Les composés majoritaires sont : Le Shyobunol (18.1%), le δ -cadinène (14.2%), l' α -cadinol (9.3%) et le t-cadinol (8.1%).

② 74 composés ont été identifiés dans la partie aérienne de la plante au stade de floraison, constituant 96.8% de la composition totale de l'H.E. L' α -pinène (5.6%), le β -pinène (1.8%) et le limonène (2.2%) assurent une note de tête boisée, le fenchyl acétate (7.3%), l'aristolène (6.1%), le γ -cadinène (4.6%) et le δ -cadinène (10.1%) assurent une note de fond épicée, avec un arôme puissant qui rappelle l'odeur de la plante. Les indices physiques de cette huile sont proches à ceux de la majorité des autres huiles essentielles citées dans la littérature : la densité relative est de 0.933 et l'indice de réfraction est de 1.503 (à 20 °C).

L'étude de la composition chimique des H.E. de la férule au deux stades de maturation (jeune et adulte) nous permet d'émettre l'hypothèse suivante : Puisque le Shyonubol, composé majoritaire (18.1%) de l'H.E. au stade jeune, disparaît à la floraison, pour laisser apparaître le viridiflorol (13.4% contre 0.1% au stade jeune), le farnésol (8.1% contre 0% au stade jeune) et le fonénol (5.24% alors qu'il est absent au stade jeune) laisse penser que le shyobunol est le précurseur de la biosynthèse de ces composés, néanmoins, il reste à confirmer cette hypothèse par des modèles de réactions de bioconversion adéquates répondant bien à cet effet.

Selon les entités chimiques majoritaires, qui constituent les H.E. de la férule (*Ferula vesceritensis*, Coss. et Dur.), on peut les classer dans la catégorie des H.E. à composition non sulfurée avec prédominance sesquiterpénique selon la classification proposée par Sahebkar A. et Iranshahi M. (2010).

La prédominance du viridiflorol, du farnésol et du fonénol dans l'H.E. de la plante au stade adulte et du shyobunol dans l'H.E. des feuilles de la jeune plante suggère qu'il s'agit **d'un nouveau chimiotype non décrit auparavant.**

La détermination du rendement d'extraction de la fraction non volatile révèle une légère différence quantitative entre les deux stades végétatifs : 13.37 % et 14.2 % (m/m) respectivement au stade jeune et adulte. Ces valeurs sont très élevées comparativement aux autres espèces de férule. Dans la fraction non volatile, les phénols totaux dosent 20.5 mg éq. AG. /g d'extrait au stade jeune,

cette quantité sera doublée à la floraison: **45.7 mg éq. AG. /g d'extrait**. La même chose est notée pour les flavonoïdes qui passent de **19 à 34.3 mg éq. Qr. /g d'extrait**. L'extraction de la fraction non volatile du thym (*thymus munbyanus* Boiss et Reut.), a donné un rendement de **14.63%**, alors que celui de l'extrait non volatil de l'épazote (*Dysphania ambrosioides* L.) n'est que de **9.78%**. L'activité antioxydante des H.E., évaluée par trois tests de référence, s'est avérée faible dans l'ensemble comparativement à l'antioxydant de synthèse : BHT, toutefois elle diffère selon le stade végétatif dont il est question. En ce qui concerne l'activité de piégeage (scavenging) du radical DPPH, ce n'est qu'à la floraison qu'on enregistre une faible activité sans avoir déterminé l'IC₅₀. Alors que le pouvoir réducteur de l'H.E. est moyennement faible, et dans les deux stades végétatifs, l'H.E. possède les mêmes propriétés réductrices vis-à-vis des ions ferriques. En revanche, le test TBARS nous a permis de constater une bonne activité antioxydante de l'H.E. au stade jeune avec une IC₅₀ de **314.85 mg/l**, alors qu'à la floraison cette activité baisse sensiblement. Contrairement à l'H.E., l'extrait éthanolique de *F. vesceritensis* est doué d'une bonne activité antioxydante, en effet son activité antiradicalaire **est comparable** avec le BHT, notamment à la floraison où l'on enregistre une IC₅₀ de **159.48 mg/l**. Quant au pouvoir réducteur de cet extrait, il est excellent à tel point **qu'il dépasse le pouvoir réducteur du BHT pour des concentrations supérieures à 400 mg/l**, cela est remarqué surtout à la floraison où l'extrait est plus riche en phénols totaux et en flavonoïdes.

Dans un autre volet de l'activité biologique, l'activité antimicrobienne de l'H.E. de la plante étudiée (la fêrûle) a été mesurée en la comparant avec l'H.E. du thym (*T. munbyanus* Boiss et Reut.) connu par son très bon pouvoir microbicide. Premièrement, le test qualitatif de la sensibilité des souches microbiennes (bactéries et levures) vis-à-vis des deux huiles essentielles par la méthode des disques a permis de visualiser une faible activité de l'huile essentielle de la fêrûle contre tous les microorganismes, sauf pour la bactérie de Gram négatif *Klebseilla. Pneumoniae* qui est relativement plus sensible avec un diamètre d'inhibition de 15 mm, alors que l'huile essentielle de thym révèle une très grande agressivité contre tous les microorganismes.

Deuxièmement, le test quantitatif a permis de déterminer les CMI des H.E. contre les différentes souches testées. L'huile essentielle du thym s'est révélée capable d'entraîner une inhibition totale de la croissance de tous les microorganismes testés par des doses inférieures ou égales à 0.25 % (CMI < 0.25 %). Alors que l'huile essentielle de la fêrûle possède une CMI de 0.125 % contre *Staphylococcus Aureus* et *Saccaromyces cervisiae*, et une CMI de 0.25 % contre *Bacillus subtilis* et *Klebseilla pneumoniae*, tandis que les CMI de cette H.E. contre *E. coli* et

Candida albicans sont plus élevés à 2 % (CMI > 2 %), ces deux dernières souches sont donc très résistantes à l'H.E. de la férule.

De manière brève, on peut dire que l'H.E. de la férule possède un effet inhibiteur de la croissance de toutes les souches testées à l'exception d'*E. Coli* et de *Candida albicans*. Cependant, il convient de déterminer les CMB qui ont un intérêt plus grand.

Enfin, nous pouvons affirmer que les plantes étudiées *F. vesceritensis* Coss. et Dur. et *thymus munbyanus* Boiss et Reut. , possèdent grâce aux substances actives de leurs métabolismes secondaires des propriétés biologiques très intéressantes en vue d'une exploitation ultérieure dans divers secteurs, notamment en agroalimentaire.

Les résultats que nous avons obtenus dans leur ensemble ont contribué à élargir les connaissances sur deux plantes endémiques algériennes mais ils ne constituent qu'une étape très modeste de l'investigation des richesses que peut apporter ces plantes phytogénétiques. Il est donc préférable d'approfondir davantage la recherche, pour toucher d'autres côtés non abordés, et pour cela on recommande :

- ① D'étudier les propriétés antimicrobienne et insecticide de l'extrait végétal qui a montré une bonne activité antioxydante ;
- ② D'étudier les propriétés biologiques de chaque partie des plantes isolément : racines, feuilles, stipes, inflorescences, graines...etc. ; particulièrement la férule.
- ③ D'optimiser les procédés d'extraction des H.E. et des extraits végétaux et d'en étudier l'influence sur les rendements, sur la composition chimique et sur les différentes activités biologiques ;
- ④ De rechercher les constituants les plus actifs responsables de l'activité biologique et d'étudier l'optimisation des méthodes de leurs isolement, purification et utilisation ;
- ⑤ D'étudier le côté toxicologique des plantes afin d'évaluer les risques sur l'alimentation humaine ainsi que pour déterminer les doses admissibles ;
- ⑥ D'effectuer des essais d'incorporation des matières actives issues de ces plantes dans les divers aliments : céréales et produits céréaliers, huiles végétales, concentrés de fruits et légumes... etc.
- ⑦ De se focaliser sur l'étude de la variabilité de la composition chimique en tenant compte de l'âge de la plante, de la période de la récolte, du lieu, etc. Ceci va permettre d'observer les différents changements sur plan qualitatif et quantitatif des huiles essentielles afin d'estimer à quelles conditions ou à quelle période telle ou telle huile essentielle pourrait donner un rendement

satisfaisant ou avoir une activité biologique intéressante. (antioxydantes, insecticides/insectifuges, antifongiques, bactéricides ou antimicrobiennes en général).

De même, la valorisation du secteur des plantes aromatiques peut servir de levier à un nouvel essor économique durable dans les Etats possédant une richesse floristique et qui souffrent d'une crise économique liée à la chute des prix des matières premières locales. Les pays africains à leur tête l'Algérie, dont la flore aromatique est diversifiée devraient désormais se tourner vers le développement des priorités fondées sur les ressources naturelles en l'occurrence les plantes aromatiques. L'inventaire de ces plantes à huiles essentielles doit se poursuivre, pousser loin les études scientifiques jusqu'à leur valorisation durable tout en limitant autant que possible l'importation des huiles et des additifs synthétiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Abedi D., Jalali M., Asghari G., et al., (2008).** Composition and antimicrobial activity of oleogumresin of *Ferula gumosa* Bioss. Essential oil using Alamar Blue. Research in Pharmaceutical Sciences, vol. 3, n. 1, p.p. 41-45
- Adebayo A.Bbolade, Vania Tira-Picos , Jose M.F. Noguera , (2010).** Chemical constituents of *Chenopodium ambrosioides* var.anthelminticum herb essential oil from Nigéria.Chemistry of natural compounds,vol.46, n.4.
- Akoh C., & Min H., (2008).** Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnologies. New York, CRC Press Inc, 928p. (food Science and tecknology)
- Alais C., Linden G., Miclo L., (2008).** Biochimie alimentaire : Abrégé. Paris, Dunod, 260p. (Sciences sup).
- Altarejos, J., Salido, . S., Perez-Bonilla, M., Linares-Palomino, P.J., Van Beek, T.A., Noguera, M. et Sanchez, A (2005)** "Preliminary assay on the radical
- Anonyme, 2003.** Major groups, families and Genera: Lamiaceae (Labiatae). Science and Horticulture, Royal Botanic Garden. Kew UK.
- Anonyme.,(2010).** Monographie : *Chenopodium ambrosioides*.Association jardins du monde. Antiproliferative behaviors of seven plants.Journal of Agricultural and food Chemistry, vol.49, p.p.3321-3327.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. et Robards, K. (2002)** "Methods for testing antioxidant activity." *Analyst*, 127. pp.183-198.
- Azefack T.L.,Adler C.,Bouda H., Ajong F.D., (2003).** Bioefficacy of powders and essential oils from leaves of *cheponodium ambrosioides* and *Eucalyptus saligna* to the cowpea bruchid , *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera , ruchidae).Cahiers Agricultures.vol.12,n.6 .p p.401-407.

B

Bakkali F. et al., (2007). Biological effects of essential oils-A review in science direct. *Food and Chemical Toxicology*, n. 46, p.p. 446-475

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

Bamoniri A., Mazoochi A., (2009). Determination of bioactive and fragrant molecules from leaves and fruits of *Ferula assa-foetida* L. growing in central Iran by nano scale injection. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* vol. 4, n. 2, p.p. 323 – 328

•**Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R. et Gruzdiene, D. (2000)** "Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil." *Food Research International*, 33 p.p. 785-791.

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

•**Barlow, S.M. (1990)** "Toxicological aspects of antioxidants used as food additives." *Ed.*

Hudson, B.J.F, Food Antioxidants: pp.253-307.

•**Basil A., Jimenez-Carmona M.M., Clifford A.A., (1998).** Extraction of rosemary by superheated water. *Food Chemistry*, Vol. 46, p.p. 5205 – 5209.

Benayad N.,(2007).Rapport d'activité utilisation des huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines comme insecticides pour lutter contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées (blé, maïs, riz...) et ceci sans altérer la qualité

nutritive de ces denrées et surtout pour minimiser l'utilisation des insecticides chimiques dangereux. Rabat, université Mohammed V, 7p.

Benchabane O., Hazzit M., Baaliouamer A., Mouhouche F. (2012). Analysis and antioxidant Activity of the essential oils of *Ferula Vesceritensis* Coss. et Dur. and *Thymus munbyanus* Desf. Vol. 15 n° 5

• **Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini J.F., Costa J., (2007).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, Vol. 106, p.p. 132 – 139.

Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A. (1988). Extraction des huiles essentielles. *Chimie et technologie in information chimie*, n. 298, p.p. 179-184

Bermond, P. (1990) "Biological effects of food antioxidants." *Ed. Hudson, B.J.F., Food Antioxidants*: pp. 193-251.

• **Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H. et Berest, C. (1998)** "The antioxidant activity of various phenolic compounds measured by an accelerated test based on citronellal oxidation." *Sci. Alim*, 18. pp. 13-23.

Bouchouka E., Djilani A., Bekkouche A., (2012). Antibacterial and antioxidant activities of three endemic plants from algerian sahara. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, vol. 11, n. 1, p.p. 61-65

• **Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri., Baudoux D., Skali N ;S., Abrini J., (2006)** Thymus essential oils chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Congrès international de biochimie , Agadir, Maroc.

Bouzitouna N. , (2008). Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de la Tunisie*, n.10, p.p. 119-125

Bown D.,(1995). Encyclopaedia of herbs and their uses, Dorling Kindersley , London.

Branen, A.L. (1975) "Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52.pp. 59-63.

Bruneton J.,(1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris, Lavoisier, 623p. (Technique et Documentation).

Bruneton J., (1995). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris, Lavoisier, 915 p. (Technique & documentation)

Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinale. Tech & doc-Lavoisier, Paris, 585 p.

Burkill H. M., (1985) . The useful plants of west tropical Africa (Families A-D),Royal Botanic Gardens , London , p.366.

C

Calliste C. A., Trouillas P., Allais D. P., (2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 49, p.p.3321–3327.

Camara A., (2009). Lutte contre *Sitophilus oryzae* L. (COLEÓPTERA: CURCULIONIDAE) et *Tribolium Castaneum* HERBST. (COLEÓPTERA: TENEBRIONIDAE) dans les stocks de riz par la technique d'étuvage traditionnelle pratiquée en basse-guinée et l'utilisation des huiles essentielles végétales, thèse doctorat en sciences de l'environnement. Université du Québec à Montréal, p 154.

Cardiet G., Fuzeau B., Barreau C., et al., (2011). Contact and fumigant toxicity of some essential oil constituents against a grain insect pest *Sitophilus oryzae* and two

fungi, *Aspergillus westerdijkiae* and *Fusarium graminearum*. J Pest Sci DOI 10.1007/s10340-011-0400-3, 8p.

Cavalli J.F., Tomi F., Bernardini A.F., Casanova J., (2004) .
Phytochem.Anal.vol.15,p.275.

Chehema A., (2006). Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Aïn M'lila, Dar Elhouda, 150 p.

Chen, J.H. et Ho, C.T. (1997) "Antioxydant Activity of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**. pp.2374-2378.

Chevallier A., (1996). The Encyclopedia of medicinal plants Dorling Kindersley.
London.

Chikhoun A., (2007). Huiles essentielles du thym et d'origan : étude de la composition, de l'activité antioxydante et antimicrobienne. Thèse de Magister en agronomie, El-Harrach-Alger, Institut national agronomique,

Cillard J. (2006). Mécanismes de peroxydation lipidique et des antioxydants. Laboratoire de biologie cellulaire et végétale. Groupe de recherches thérapeutiques, Faculté de pharmacie, Rennes, vol 13, n. 1, p.p. 9-24

Comway G.A. and Slocumb J.C.(1979).Plants used as abortifacients and emmenagogues by spanish new mexicans.Journal of Ethnopharmacology.n°1.vol.3.pp.241-261.

Conner D.E., (1993). Naturally occurring compounds: antimicrobials in foods. Ed. Davidson, New York, 468p.

Croguennec T., (2006). Science des aliments : Stabilisation biologique et physico-chimique. Tech & doc-Lavoisier, Paris, 382 p.

Cuvelier, M., Richard, H. et Berset, C. (1992) "Comparaison of the antioxydant activity of some acid-phenols: structure-activity relationship." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56. pp.324-325.

D

Dalton, D.A. (1995) "Antioxidant defences of plants and fungi." *Ed. Oxidative Stress and Antioxidant Defences in Biology*.pp. 298-355.

Dapkevicius, A. (1998) "Antioxidant activity of extract obtained by different isolation procedures from some Aromatic herbs grown in Lithuania." *Journal of science of food and agriculture*, 77.pp.140-146.

Decker, E.A. (1998) "Antioxydant mechanisms." *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* .pp. 397-423.

De Groot I.,(2004). Protection des céréales et des légumineuses stockées. Pays Bas, Fondation Agromisa, Wageningen, Digigrafi, 2 éd., 74p.

Dehpour A. A., Ebrahimzadeh M., Seyed Mohammad N.,(2009). Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *GRASAS Y ACEITES*, vol. 60, n. 4, p.p. 405-412

Delobel A., et Tran M.,(1993). Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes. Paris, éd. Orstom, 424p. [Collection faune tropicale]

Derbalah A. S., Ibrahim Ahmed S., (2011). Oil and powder of spearmint as an alternative to *Sitophilus oryzae* chemical control of wheat grains. *Journal of Plant Protection Research*, vol. 51, n. 2, p.p. 145-150

Draglant S., Senoo H., Wake K., Blomhoff R., (2003) . Several culinary and medicinal herbs are important source of dietary antioxidants. *The Journal of nutrition*, vol. 133, p.1286.

Dorman D.H.G., Bachmayer O., Kosar M. et Hiltunen R., 2004. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 762-770.

Dumortier D. (2006). Contribution à l'amélioration de la qualité de l'huile essentielle d'ylang-ylang (*Cananga odorata* (Lamarck) D.J. Hooker Thomson, variété genuina) des Comores. Mémoire d'ingénieur, faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, Belgique, 91p.

E

Essawi, T. et Srour, M. (2000) "Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity." *Journal Of Ethnopharmacology*, 70, pp. 343-349.

Evans, R.J. et Reynhout, G.S. (1992) "Alternates to synthetic antioxidants." *Food Science and human Nutrition*, 29, pp. 27-42.

Eymard S., (2003). Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. Thèse de doctorat, Ecole polytechnique de l'Université de Nantes, France, 125 p.

F

Ferrari B., Tomi F., Casanova J., (2005). Composition and chemical variability of *ferula communis* essential oil from Corsica. *Flavour fragr.J.* 20, pp.180-185.

Finely, J.W. et Otterburn, M.S. (1993) "The consequence of free radical in foods. In Antioxydants. chemical, physiological, nutritional and toxicological aspects." *Toxicology and industrial Health*. pp. 77-91.

Frankel, E.N. (1996) "Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality." *Food Chemistry*, 57.pp. 51-55.

Frankel, E.N. (1998) "Lipid oxidation." *The oily Press, 1st edition*.

Frankel, E.N. et Meyer, A.S. (2000) "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants." *Journal of science of food and agriculture*, 80.pp.1925-1941.

Fraternale, D., Giamperi, L., Bucchini, A. et Ricci, D. (2006) "Chemical Composition, Antifungal and In Vitro Antioxidant Properties of *Monarda didyma* L. Essential Oil." *Journal of Essential Oil Research*, 18.pp. 581-585.

Foster J., Duke A., (1990). A Field Guide to Medicinal Plants. Eastern and Central North America. Houghton Mifflin Co.

Fouché J. G., 52000°. Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman

Franchomme P., Pénéol D., (1990). L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Ed. Roger Jallois. Limoges. 445 p.

Fukumoto, L.R. et Mazza, G. (2000) "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48.pp. 3597-3604.

G

Gadano A., Gurni A., Lopez P., Ferraro G., Carballo M., (2002). In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium*

Gamal-Eldeen A. M. Hegazy M.-E.F., (2010). A crystal lapiferin derived from *Ferula vesceritensis* induces apoptosis pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, vol. 24, n. 3, p.p. 246-257

Garnero J., (1996). Huiles essentielles. Ed. Techniques de l'ingénieur, p.p. 1 – 45.

Garcia-Plazaola, J.I. et Becerril, J.M. (1999) "A rapid HPLC method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols." *Phytochemical Analysis*, 10, pp.307-313.

Gebicki, J.M. et Guille, J. (1989) "Spectrophotometric and High-performance Chromatographic assays of hydroperoxides by the iodometric technique." *Anal. BioChem*, 176. pp.360-364.

Graille J.,(2003). Lipides et corps gras alimentaires. Paris, tech & doc, 469p. (science et technique agroalimentaire)

Grieve ,(1984). A Modern Herbal .Penguin .ISBN0-14-046-440-9.

Gunstone Fo., Norris Fa., (1983). Lipids in Food-Chemistry. Biochemistry and Technology, Pergamon Press, p.p.161-165.

H

Habibi Z., Reza Aghaie H., Ghahremanzadeh R., (2006). Composition of the essential oil of *Ferula azowitsiana* DC., *Artemisia squamata* L. and *Rhabdosciadium*

petiolare Boiss. & Hausskn.ex Boiss. Three Umbelliferae herbs growing wild in Iran. Journal of Essential oil Research (JEOR), vol. 18, n. 5, p.p.503-505

Halliwell, B. (1995) "Antioxydant characterisation. ." *Methodology and mechanism*, 49.pp. 1341-1348.

Haraguchi H.,Nishimura T.,Takeushi A.M.,(1996). *Planta Med.*vol.216,n.62.

Hanasaki, Y., Ogawa, S. et Fukui, S. (1994) "The correlation between active oxygen scavenging and oxidative effects of flavonoids." *Free.Rad.Biol.Med*, 16.pp. 845-850.

Hazzit M., Baaliouamer A., Faleiro M. L.,Miguel M.G., 2006. Composition of the essential oils of *thymus* and *Origanum* species from Algéria and their oxidant and antimicrobial activities. *J. agric. food chem.* 54(17) pp.6314-6321.

Heath, H.B. (1981) "Source book of flavours." *Ed. Springer, 1st edition.*

Heilman, J., Merfort, I. et Weiss, M. (1995) "Radical Scavenging activity of different 3',4' dihydroxyflavonols and 1,5-dicaffeoylquinic acid studied by inhibition of chemiluminescence." *Planta Medica*, 61. pp.435-438.

Hilan C., Sfeir R., El Hage R., (2007). Evaluation of the antibacterial Activities of *Ferula hermonis* (boiss.). *Lebanese Science Journal*, vol. 8, n. 2, 2007, p.p.135-151

Hiramatsu, M., Yoshikawa, T. et Inoue, M. (1994) "Food and free radicals." *Proceedings of the first symposium on Food and Free radicals, Yamagata, Japan.*

Hochberg M., Kohen R., Enk C.D.,(2006. Role of antioxidants in prevention of pyrimidine dimmer formation in UVB irradiated human HaCaT keratinocyte. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 60, p.p. 233-237.

Hostettmann K., (2006). L'importance des techniques couplées (LC/UV/MS et LC/UV/RMN) dans l'identification de nouvelles substances végétales et dans le contrôle de qualité de plantes médicinales et de phytomédicaments. *Laboratoire de*

Pharmacognosie et Phytochimie, Ecole de Pharmacie Genève-Lausanne, CCCTA Villars, 50p.

Huang, D., Ou, B. et Prior, R.L. (2005) "The chemistry behind antioxidant capacity assays." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53. pp.1841-1856.

Huxley A.,(1992).The New RHS Dictionary of Gardening.MacMillan Press 1992ISBN 0-333-47494-5.

J

Jacobson, G.A. (1993) "Evaluation of oxidized lipids in food." *Inform*, 4,pp. 811-819.

Jalas J., (1971). Note of thymus L.(Labiatae) in Europe.Supraspecific classification and nomenclature.Botanical Journal of the Linnean society,vol.64.pp.199-215.

Jardim C.M.,Jham G.N.,Dhingre O.D.,Freire MM,(2008).Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides*.L .Journal of chemical ecology,vol.34,n9,pp 1213-1218.

Jirovetz L.,Buchbauer G.,Fleischhacker W.,Kaul V.K.(2000),Sci.Pharm..vol.68, p.123

Johnson M.A.,(1984). Biosynthesis of ascaridole.Archiv.biochem.biophys.vol.235, pp.254-256.

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.

K

Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Aït -Kaki Z., Benlabed K., (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The international Journal of aromathérapie*, vol. 15, pp. 129-133.

Kanner J., German J.B., Kinselle J.E., (1994). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Food science and nutrition*, vol. 25, p. 317.

Karleskind A., (1992). *Manuel des corps gras*. Paris, Lavoisier, 787p.

Kartal N., Sokmen M., Tepe B., (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100 (2007) p.p. 584-589

Kauffmann , M. et Wink, M. (1994) .Molecular systematics of the Nepetoideae (family Labiatae): phylogenetic implications from rbcL gene sequences." *A Journal of Biosciences* 49. 635-645.

KHALFI-Habes O., SELLAMI S., (2010). Activité biologique de trois huiles essentielles extraites de plantes algériennes sur *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera : Bostrychidae). In : Septième Congrès de l'AMPP - 26-27 mai 2010-: Congrès de l'association marocaine de protection des plants (AMPP), Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, 6 p.

Kishore N., Chansouria J.P.N., Dubey N.K., (1999). Antidermatophytic action of the essential oil of *Chenopodium ambrisioides* and an ointment prepared from it. *India Phytother. Res.* vol. 10, pp. 453-455.

Koba K., Catherine G., Raynaud C., Chaumont J.P., Sanda K., Laurence N., (2009). Chemical composition and cytotoxic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil from Togo Bangladesh *J.sci.ind.res.* vol. 44, pp. 435-440.

Koehler P. G.,(2012). Rice Weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Entomology and Nematology Department, University of Florida, IFAS Extension, 2p.

Kose E.O., Akta Ö., Deni I.G., (2010). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of endemic *Ferula lycia* Boiss. Journal of Medicinal Plants Research, vol. 4, n. 17, p.p. 1698-1703

Kumar R., Kumar M.A.,DubeyN.K.,Tripathi Y.B.,(2007).Evaluation of *chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal,antiaflatoxic and antioxidant activity.International Journal of food microbiology.vol.115,pp.159-164.

L

Labuza, T.P. (1971) "Kinetics of lipid oxidation in foods." *Critical Reviews in Food and Technology*, 2. 355-405.

Lardy J.M., Haberkorn V., (2007). Les huiles essentielles : principes d'utilisation.*Kinesither Review*, N°. 61. p.p. 18 – 23.

Larson, R.A. (1997) "Naturally occurring antioxidants." *Ed. Boca raton*.

Le réseau de la botanique francophone.

Lieutaghi, P. (1966) "Le livre des Bonnes Herbes." *Ed. Robert Morel*.

Linderschmidt, R., Trylka, A., Goad, M. et Witschi, H. (1986) "the effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice." *Toxicology*, 38.p.p. 151-160

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. 143 p.

Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F.,(2007). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineer*, Vol. 79. p.p. 1079 - 1086.

Lust J.,(1983). The herb book. Bantam books, ISBN 0-553-23827-2.

M

Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. et Salunkhe, D.K. (1995) "Toxicological aspects of food antioxidants." *Food antioxidants. Technological and Health perspectives*.

Maggi F., Lucarini D, Tirillini B., (2009). Chemical analysis of the essential oil of *Ferula glauca* L. (Apiaceae) growing in Marche (central Italy). *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 37 (2009) p.p. 432–441

Malloy , D.M.,(1923). Pharmacology and therapeutics of oil of *Chenopodium* and investigation on the anthelmintic value of its components. *J.Pharmacol* .vol.212,pp.391-400.

Mamoci E., Cavoski I., Simeone V.,(2011). Chemical Composition and In Vitro Activity of Plant Extracts from *Ferula communis* and *Dittrichia viscosa* against Postharvest Fungi. OPEN ACCESS: *Molecules*, vol. 16, p.p. 2609-2625

Mann J. (1987). Secondary metabolism. Second edition, Clarendon press, Oxford, p.374

Marco, G.J. (1968) "A rapid method for evaluation of antioxidants." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45, pp. 594-598.

Marinova, E. et Yanishlieva, N. (1992) "Inhibited oxidation of lipids II: comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids." *Fat Science Technology*, 94, pp. 428-432.

Menaceur F., (2011). Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles et extraits du romarin (*Rosmarinus eriocalyx* et de la lavande (*Lavanula stoechas*). Mémoire de magister en sciences agronomiques, El Harrach, Ecole National Supérieure d'Agronomie, 197p.

Meziane R., Naimi H., (2011). Etude comparative de l'effet antioxydant des extrait phénoliques de *Thymus pallescens*, *Thymus algeriensis* et *Thymus munbyanus*, et de l'Huile essentielle de *Thymus munbyanus*. Mémoire d'ingénieur en sciences agronomiques, El-Harrach, Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA ex. INA), 99 p.

Miguel G., Simoes M., Figueiredo, A. C., Barroso J. G., Pedrp L. G., Carvalho L., (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititus*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chem.* vol.86, p.183-188.

Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. et Milner, A.A. (1993) "Novel methods for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates." *Clin.Sci*, 84,pp. 407-412.

Miller, N.J., Castelluccio, C., Tijburg, L. et Rice-Evans, C. (1996) "The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators." *FEBS Letters*, 392:pp. 40-44.

Miura, T., Muraoka, S. et Ogiso, T. (1998) "Antioxidant activity of adrenergic agents derived from catechol " *Biochem.Pharmacol*, 55.pp.2001-2006.

Moll M., Moll N.,(1998). Les additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed. Dunod, Paris, 218 p.

Moller, J.K.S., Hirai, K. et Tkezoe, R. (1991) "Tocopherol and fluorescence levels in deepfrying oil and their measurment for oil assessment." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68.pp. 163-166.

Moreau, F. (1960) "Botanique : Procaryotes (cyanophites et bactéries). Eucaryotes (algues, champignons et végétaux supérieurs). La plante dans ses rapports avec le milieu." *Ed. Paris, Gallimard.*

Morales R., 1997. Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. *Lagascalia*, 19, 249-262.

Moro-Buronzo A. (2008). Grand guide des huiles essentielle : santé beauté et bien-être. Paris, Hachette pratique, 254p.

Mosyakin ,S.L.,Clement S.E.,(2002).New nomenclatural combinations in *Dysphania* R.Br. (*Chenopodiaceae*) taxa occuring in north america. *Ukr. bot. Zhur.*59(4).pp.380-385.

Mouffok B., Raffy E., Urruty N.,(2008). Le neem, un insecticide biologique efficace. Université Paul Sabatier, France, 14p.

Mouhouche F., Fleurat-Lessard F., Bouznad Z., (2009). Laboratory assessment of toxic activity of purified peptides extracted from chickpea seeds to two strains of the rice weevil *Sitophilus oryzae*(L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, vol. 45, p.p. 261–269

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez , J.M. et Sineiro, J. (2001) "Natural antioxydants from residual sources." *Food Chemistry*, 72: 145-171.

MuhayimanaA.,Chalchat J.C.,Garry R.P.,Essent J.(1998).Oil research.vol.10.p.690.

N

Namiki, M. (1990) "Antioxidants/Antimutagens in Food." *CRC critical reviews in food science and nutrition*, 29: 273-300.

Ndiaye D. S. B., (1999). Manuel de stockage et de conservation des céréales et des oléagineux. Cooperation Autrichienne pour le Developpement, 61p.

O

Okazaki K., Kawazoe K., Takaishi Y., (2002). Human platelet aggregation inhibition from thyme (*thymus vulgaris L.*) *Phytother*, vol.4, p.398-399.

Opkyde ,D.L.J., (1976). *Food .cosmet.toxicol.*, vol.14, p.713.

Oughlissi-Dehak K., Lawton P., Michalet S., Bayet C., Darbour N., Hadj-Mahammed M., Badjah-Hadj-Ahmed Y.A., Dijoux -Franca M.-G., Guillet D., (2008) *Sesquiterpenes from aerial parts of Ferula vesceritensis.* *Phytochemistry*, 89, pp.1933-1938.

Outaleb T., (2010). Huiles essentielles et extraits de romarin : composition chimique et activités antioxydante. Mémoire de magister en sciences agronomiques, El Harrach, Ecole National Supérieure d'Agronomie, 112p.

P

Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., 2000. Antioxydants in food: practical applications. Ed. Woodhead, 388 p.

Perez-Bonilla, M., Salido, S., Van deek, T.A., Linares-Palomino, P.J., Altarejos, J., Noguerras, M. et Sanchez, A. (2006) "Isolation and identification of radical scavengers in olive (*Olea Europaea*) wood." *Journal of hromatography A*, 1112.p.p. 311-318.

Perrin J.L., (1992). Les composés mineurs et les antioxydants naturels de l'olive et de son huile. *Revue française des corps gras*, n.4, p.p.25-32.

Pibiri M.C., (2000)5. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Ecole polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse, 161 p.

Pietta, P.G. (2000) "Flavonoids as antioxidants." *Journal of natural products*, 63. pp.1035-1042.

Pino J.A.,Marbot R.,Real I.M.,(2003) .Oil Research,vol.15,p.213.

Pollack Y.,Segal R.andGolenser J. ,(1990).The effect of ascaridole on the development of *Plasmodium falsiparum*.Parasitol Res.vol.76,n°7,pp.570-572.

Pratt, D.E. (1980) "Natural antioxidants of soybean and other oil seeds." *Ed. M.G. Simic, and M. Karel, Plenum, Autoxidation in food and biological systems*: pp.261-282.

Prior, R.L. et Cao, G. (1999) "In vivo total antioxidant capacity: comparaison of different analytical methods." *Free Rad. Bio. Med*, 27. pp.1173-1181.

Q

Quezel P., Santa S., Shotton O., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 1170 p.

R

Ragnarsson, J.O., Leick, D. et Labuza, T.P. (1977) "Accelerated temperature study of antioxidants." *Journal of Food Science*, 42. pp.1536-1544.

Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H. et Kawakishi, S. (1995) "The contribution of plant food antioxidants to human health." *Trends Food Science and Technology*, 6, pp.75-82.

Ranalli A., Lucera L. & Contento S.,(2003). Antioxidizing potency of phenol compounds in oil olive mill wasterwaster. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51p.

Regnault-Roger C.,(2008). Biopesticides d'origines végétales, 2 éd. Paris, Technique & documentation, 496p.

Reza Akhgar M., Rustaiyan A., Masoudi S., (2005). Essential oil of *Ferula macrocolea* (Boiss.) Boiss. and *Ferula hirtella* Boiss. from Iran. *Journal of Essential oil Research (JEOR)*, vol. 17, n. 3, p.p.237-238

Rice-Even, C. et Miller, N.J. (1994) "Total antioxidant status in plasma and body fluids." *Methods in Enzymology*, 234, pp.279-293.

Richard H. , Bendjilali B., Banquour N., Baritaux O.,(1985). Etude de diverses huiles essentielles de thym du Maroc.*Lebensm-wiss U-technol*, n.18, pp.105-110.

Richard H.,Multon J.L., (1992). Epices et aromates. Ed. Tec & Doc-Lavoisier, paris, 339 p.

Richard H., Benjilali B., Bauquour N., (1985). Etude de diverses huiles essentielles de thym du Maroc. *Lebensm-Wiss U-Technol*.

Robert G., (2000). Les Sens du Parfum. Ed. Osman Eroyllles, Paris, 224 p.

Rustaiyan A., Nadimi M., Mazloomifar H.,(2005). Composition of the essential oil of *Ferula macrocolea* (Boiss.) Boiss. from Iran. *Journal of Essential oil Research (JEOR)*, vol. 17, n. 1, p.p.55-56

S

Sahebkar A. et Iranshahi M., (2010). Biological activities of essential oils from the genus *Ferula* (Apiaceae). *Asian Biomedicine*, vol. 4, n. 6, p.p. 835-847

Sahu, S.C. et Gray, G.C. (1993) "Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: Nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin." *Cancer Letters*, 70, pp.73-79.

Schuller, P. (1990) "Natural antioxidants exploited commercially." *Ed. Hudson, B.J.F, Food Antioxidants: 99-113.*

Sharma S., Sangwan N.S. et Sangwan R.S., (2003). Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current science*, Vol. 84, N°. 25, p.p. 544 – 550.

Sell C.S.,(2006). The chemistry of fragrance. From perfumer to consumer. Ed. Royal society of chemistry. Cambridge, 329 p.

Seck D., (1991). Importance économique et développement d'une approche de lutte intégrée contre les insectes ravageurs des stocks de maïs, de mil et de niébé en milieu paysan. SAHEL PV INFO n. 33, p.p. 15-20.

Singh G.andKachroo P.,(1976).A good flora of the western himalaya but poorly illustrated,some information on plant uses.*Forest Flora of Srinagar.*

Singh Kunwar P., Sharma M., Bhatt G., et al., (2010). Antimicrobial activity of essential oil of *Ferula assafoetida* (HINGE). *Pharmacie Globale, International Journal of Comprehensive Pharmacy* vol. 1 n. 2, 3 p.121

Sipailiene, A., Venskutonis, P.R., Baranauskiene, R. et Sarkinas, A. (2006) "Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oils." *Journal of Essential Oil Research*, 18,pp. 698-703.

Smallfield B., (2001). Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*, N°. 45, p.4

Smilie W.G.,Pessoa S.B.,(1924).A study of the anthelmintic properties of the constituents of the oil of *chenopodium*.*J.pharmacol.vol.24.pp.359-370.*

Spurgeon et Porter (1981), Biosynthesis of isoprenoïd compound, 1-46.

Stahl-Biskup E., 2002.Thyme: The genus *Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London.

T

Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A. et Sakata, K. (1994) "A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish." *Biosci.Biotech.Biochem*, 58. pp.1780-1783.

Taga, M.S., Miller, E.E. et Pratt, D.E. (1984) "Chia seeds as a natural lipid antioxydants." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61.pp. 928-931

Telphon T.,(2003). ABC des huiles essentielles. Ed. Grancher, 358 p.

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

Torres de Pinedo A., Penalver P., Morales J.C., (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure–activity relationship. *Food Chemistry*, vol. 103, p.p. 55–61.

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

Valnet J., Duraffourd C.H., Duraffourd P., Cilapraz J., (1978). L'aromatogramme :nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plants & Medicine Phytotherapy*, Vol. 12, p.p. 43 – 52.

Skoog D.A.,Holler F.J.,Niemann T.A.(2003).Principe d'analyse instrumentale.Paris,DeBoeck university.p.956.

U

Ur Rahman M., Gul S., Odhano E. A., (2008). Antimicrobial Activities of *Ferula assafoetida* Oil Against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, vol. 4, n. 2, p.p. 203-206

V

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell*, vol. 39, p.p. 44-84.

Vallet C., (2006). Le NEEM, Insecticide naturel : Petit guide pratique. France. 14p. (PDF)

Vanier P., (1994). Les huiles essentielles et la thérapie par les huiles essentielles. *Guide Ressources*, Vol. 9. p.p. 69 – 73.

Vermin G., (1982). Arômes alimentaires et développement récent. Ed. Apria, 308p.

W

Wagner G.J., Wang E., Shepherd R.W., (2004). New approaches for studying and exploiting an old protuberance: the plant trichome. *Annals Botany*, Vol. 93, N°. 01, p. 3- 11.

Wanasundara, U.N. et Shahidi, F. (1994) "Stabilization of canola oil with flavonoids." *Food Chemistry*, 50.393-396.

Wang, K., Hiruki, C. et Chen, M.H. (1998) "Identification of a phytoplasma causing yellows of Monarda." *Plant Pathology*, 47: 103-106.

Weiner M.A.,(1980). Earth medicine,earth food.Ballantine books 1980 .ISBN0-449-90589-6.

Werner M., (2002). Les huiles essentielles: réveil du corps et de l'esprit. Ed. Vigot, Collection Santé Bien-être, 95 p.

Willem J.P., (2002). Les huiles essentielles : médecine d'avenir. Ed. Dauphin, Paris, 311 p.

Y

Yang, G.C., Qiang, W., Morehouse, K.M., Rosenthal, I., Ku, Y. et Yurawecz, P. (1991) "Determination of hydroperoxides in edible oils by ESR, TBA assay and LC-CL techniques." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38.pp. 896-898.

Yen, G.C. et Chen, H.Y. (1995) "Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43.pp. 27-32.

Z

Zhang, H.L., Nagatsu, A. et Sakakibara, J. (1996) "Novel antioxidants from safflower (*Carthamus Tinctorius* L.) oil cake." *Chem.Pharm.Bull*, 44: pp874-876.

Zhiri A.,2004.Huiles essentielles chémotypées et leurs synergie.Luxembourg,Éditions inspir développement.

Zhiri A., (2006). Aromathérapie in natura news : science, nutrition, prévention et santé. Fondation pour le libre choix éd. n. 12, 16p.

Ziani B.-D. C., et Raab Z., (2011). Composition chimique et activité biologique d'extraits de la rue des montagnes (*Ruta montana*), la sarriette (*Satureja calamintha*),

et de l'armoise blanche (*Artemisia herba alba*). Mémoire d'ingénieur en sciences agronomiques, El-Harrach, Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA ex. INA), 166p.



ANNEXES

PUBLICATIONS ET PARTICIPATION À DES CONGRES

Publications :

Analysis and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur. and *Thymus munbyanus* Desf.

Otmane Benchabane, Mohamed Hazzit , Aoumeur Baaliouamer , Faiza Mouhouche. Jeobp 15 (5) 2012 pp 774 – 781.

CONTRIBUTION A L'ETUDE COMPARATIVE DE L'EFFET ANTIOXYDANT DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *THYMUS MUNBYANUS* BOISS. ET REUT. ET DES EXTRAITS NON VOLATILS DE *THYMUS PALLESCENS* DE NOE, *THYMUS ALGERIENSIS* BOISS. ET REUT. ET *THYMUS MUNBYANUS* BOISS ET REUT. INRAA(2013)

BENCHABANE O. et HAZZIT M. Laboratoire de technologie alimentaire et nutrition humaine, Ecole Nationale Supérieure Agronomique(ENSA), Alger, Algérie.

Communications orales avec actes sur résumé :

Atelier régional FAO-ENSA :La valorisation des produits forestiers non ligneux dans les pays du maghreb(ENSA :18-20 décembre2012) :

Contribution à l'étude chimique des huiles essentielles et des extraits phénoliques de *Ferula vesceritensis* Coss.et de *Thymus munbyanus* Desf.

Communications par affiche avec actes sur résumé

Colloque international 50ans de formation et de recherche.ENSA 22-24 avril 2013.

Contribution à l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis* Coss. et de ses activités anti oxydante, antimicrobienne et insecticide.BENCHABANE O., HAMMOU ABDELLAH R. et HAZZIT M. Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition Humaine, ENSA, Alger, Algérie.

Analyse statistique :

1. Activité antioxydante :

1.1. Cas des huiles essentielles :

1.1.1. Influence du stade végétatif de la plante et de la concentration de l'huile essentielle de *F. vesceritensis* sur l'activité de piégeage du radical DPPH :

□□ L'essai :

Variable Y : Activité de piégeage du radical DPPH.

Facteur A : Stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle avec deux possibilités : *stade jeune* et *stade adulte* (floraison)

Facteur B : Concentration de l'huile essentielle qui varie de 100 à 1000 mg/l.

□□ Les hypothèses H à tester :

H_0^A : Le **facteur A** n'a aucune influence sur la **Variable Y**.

C'est-à-dire que les deux stades végétatifs de la plante n'entraînent pas une variation de l'activité de piégeage du radical DPPH.

H_0^B : Le **facteur B** n'a aucune influence sur la **variable Y**.

C'est-à-dire que les différentes concentrations de l'huile essentielle n'entraînent pas une variation de l'activité de piégeage du radical DPPH.

H_0^{A*B} : Il n'y a aucune **interaction** entre les facteurs **A** et **B**.

□□ Règle de décision :

Si les valeurs de signification obtenues par l'analyse de la variance sont supérieures à 0.05 (qui est le niveau du test), alors les hypothèses à tester sont acceptées. On les rejette dans le cas contraire.

□□ **Analyse de la variance (ANOVA) :**

Tableau 24 : Tests des effets inter-sujets Variable dépendante: Activité de piégeage du radical DPPH

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Modèle corrigé	1184.401	11	107.673	3043.260	.000
Constante	4446.538	1	4446.538	125676.797	.000
A	783.199	1	783.199	22136.320	.000
B	222.493	5	44.499	1257.704	.000
A * B	178.709	5	35.742	1010.204	.000
Erreur	.849	24		3.538E-02	
Total		5631.788		36	
Total corrigé		1185.250		35	

a R deux = .996 (R deux ajusté = .994)

D'après les résultats obtenus (Tableau 24) la valeur de signification du facteur A est supérieure à 0.05 alors que les autres significations sont nulles, par conséquent, l'hypothèse est acceptée, et les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{A*B} sont rejetées :

Le facteur A n'influe pas : le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle n'a pas d'effet sur le pouvoir réducteur.

Le facteur B influe : la concentration de l'huile essentielle a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

Le facteur A*B influe : il y a une interaction entre le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle et la concentration de celle-ci, qui a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

La figure suivante nous permet de constater statistiquement que plus la concentration de l'H.E. augmente, plus le pouvoir réducteur sera grand.

On remarque aussi qu'il n'y a pas de corrélation entre le stade végétatif et le pouvoir réducteur.

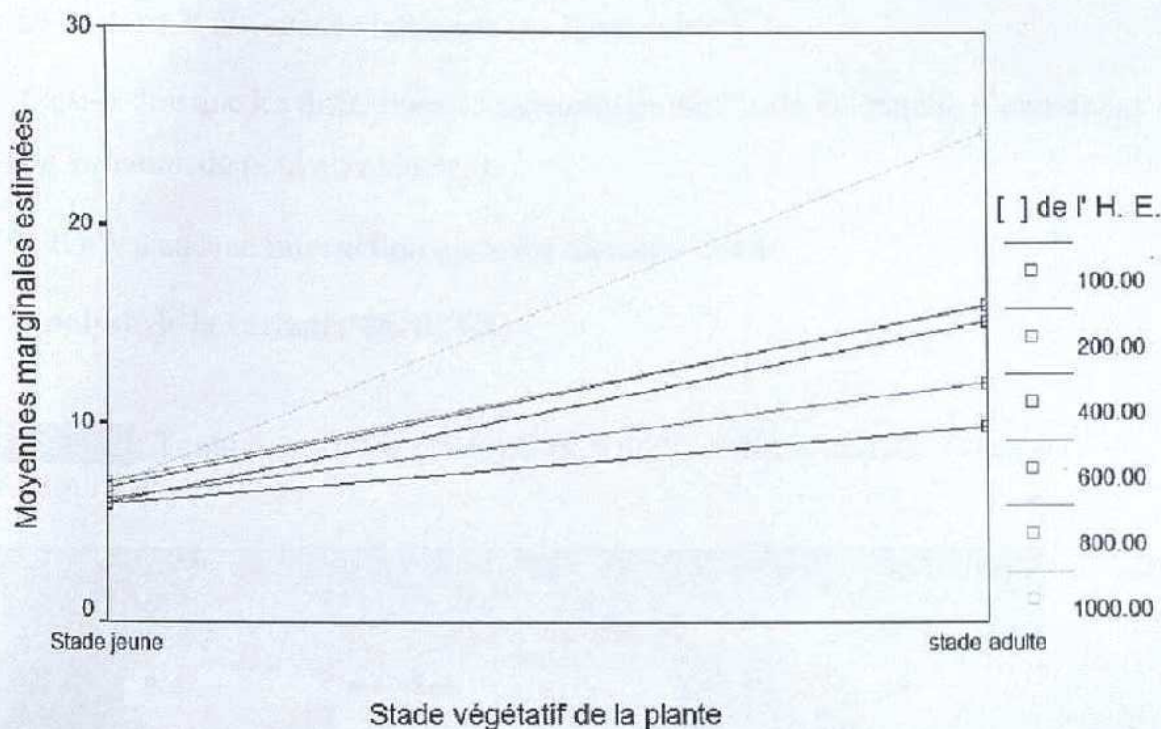


Figure 35 : variation de l'activité de piégeage du radical DPPH suivant le stade de la plante et la concentration de l'H.E.

1.1.2. Influence du stade végétatif de la plante et de la concentration de l'huile essentielle sur le pouvoir réducteur :

□ □ L'essai :

Variable Y : Pouvoir réducteur.

Facteur A : Stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle avec deux possibilités : *stade jeune* et *stade adulte* (floraison)

Facteur B : Concentration de l'huile essentielle qui varie de 100 à 1000 mg/l.

□ □ Les hypothèses H à tester : 145

H_0^A : Le facteur A n'a aucune influence sur la Variable Y.

C'est-à-dire que les deux stades végétatifs de la plante n'entraînent pas une variation du pouvoir réducteur.

H_0^B : Le facteur B n'a aucune influence sur la variable Y.

C'est-à-dire que les différentes concentrations de l'huile essentielle n'entraînent pas une variation du pouvoir réducteur.

H_0^{A*B} : Il n'y a aucune interaction entre les facteurs A et B.

❖ Analyse de la variance (ANOVA) :

Tableau 25: Tests des effets inter-sujets Variable dépendante: Pouvoir réducteur

Source	Somme des carrés de type III	d	Moyenne des carrés	F	Signification
Modèle corrigé	.965	1	8.774E-02	544.942	.000
Constante	8.951	1	8.951	55596.688	.000
A	5.625E-05	1	5.625E-05	.349	.560
B	.943	5	.189	1171.441	.000
A * B	2.203E-02	5	4.405E-03	27.362	.000
Erreur	3.864E-03	2	1.610E-04		
Total	9.920	36			
Total corrigé	.969	35			

D'après les résultats obtenus (Tableau 24) la valeur de signification du facteur A est supérieure à 0.05 alors que les autres significations sont nulles, par conséquent, l'hypothèse H_0^A est acceptée, et les hypothèses H_0^B et H_0^{A*B} sont rejetées :

Le facteur A n'influe pas : le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle n'a pas d'effet sur le pouvoir réducteur.

Le facteur B influe : la concentration de l'huile essentielle a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

Le facteur A*B influe : il y a une interaction entre le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle et la concentration de celle-ci, qui a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

La figure suivante nous permet de constater statistiquement que plus la concentration de l'H.E. augmente, plus le pouvoir réducteur sera grand.

On remarque aussi qu'il n'y a pas de corrélation entre le stade végétatif et le pouvoir réducteur.

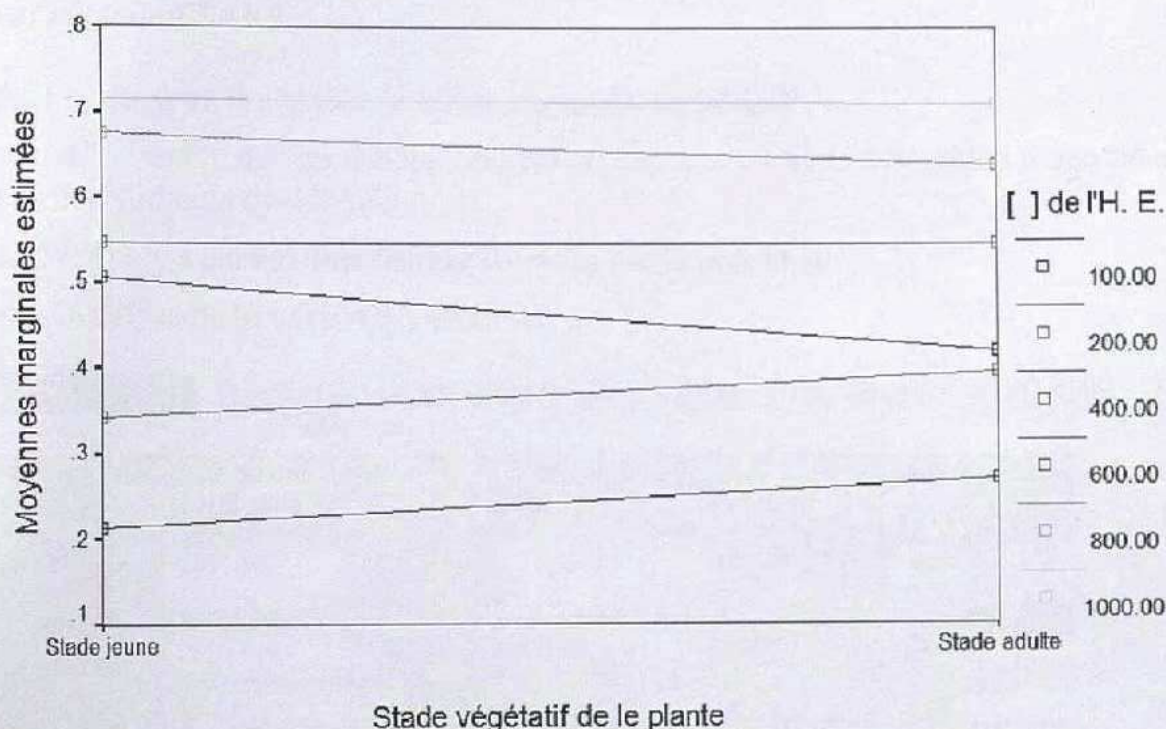


Figure 36 : Variation du pouvoir réducteur suivant le stade de la plante et la concentration de l'H.E.

1.1.3. Influence du stade végétatif de la plante et de la concentration de l'huile essentielle sur l'activité antioxydante par le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) :

❖ L'essai :

Variable Y : Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS).

Facteur A : Stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle avec deux possibilités : *stade jeune* et *stade adulte* (floraison)

Facteur B : Concentration de l'huile essentielle qui varie de 100 à 1000 mg/l.

❖ **Les hypothèses H à tester :**

H_0^A : Le **facteur A** n'a aucune influence sur la **Variable Y**.

C'est-à-dire que les deux stades végétatifs de la plante n'entraînent pas une variation du TBARS.

H_0^B : Le **facteur B** n'a aucune influence sur la **variable Y**.

C'est-à-dire que les différentes concentrations de l'huile essentielle n'entraînent pas une variation du TBARS.

H_0^{A*B} : Il n'y a aucune **interaction** entre les facteurs **A et B**.

❖ **Analyse de la variance (ANOVA) :**

Tableau 26 : Tests des effets inter-sujets Variable dépendante: TBARS

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Modèle corrigé	2781.583	11	252.871	82.820	.000
Constante	44511.089	1	44511.089	14578.268	.000
A	2235.512	1	2235.512	732.175	.000
B	448.699	5	89.740	29.392	.000
A * B	97.371	5	19.474	6.378	.001
Erreur	73.278	24	3.053		
Total	47365.950	36			
Total corrigé	2854.861	35			

a R deux = .974 (R deux ajusté = .963)

D'après les résultats obtenus (Tableau 25) toutes les valeurs de signification sont inférieures à 0.05, par conséquent, les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{A*B} sont rejetées :

Le facteur A influe : le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle a un effet significatif sur l'activité antioxydante par le test TBARS.

Le facteur B influe : la concentration de l'huile essentielle a un effet significatif sur l'activité antioxydante par le test TBARS.

Le facteur A*B influe : il y a une interaction entre le stade végétatif de la plante dans lequel on extrait l'huile essentielle et la concentration de celle-ci, qui a un effet significatif sur l'activité oxydante par le test TBARS.

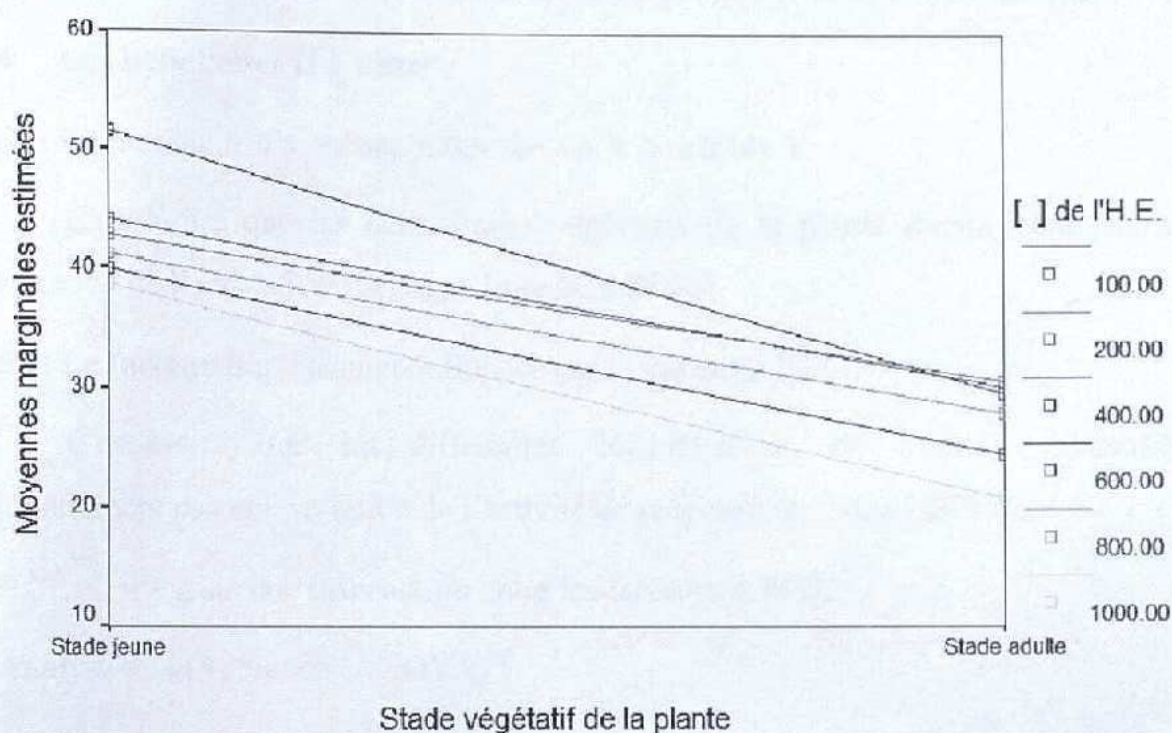


Figure 37: Variation de l'activité antioxydante (par le test TBARS) suivant le stade de la plante et la concentration de l'H.E.

La figure 66 montre que le stade jeune l'H.E. et la concentration 400 mg/l entraînent une activité antioxydante meilleure par le test TBARS.

1.2. Cas des extraits éthanoliques :

1.2.1. Influence du stade végétatif de la plante et de la concentration de l'extrait éthanolique sur l'activité de piégeage du radical DPPH :

❖ L'essai :

Variable Y : Activité de piégeage du radical DPPH.

Facteur A : Stade végétatif de la plante dans lequel on isole l'extrait éthanolique, avec deux possibilités : *stade jeune* et *stade adulte* (floraison)

Facteur B : Concentration de l'extrait éthanolique qui varie de 2 à 1000 mg/l.

❖ Les hypothèses H à tester :

H_0^A : Le **facteur A** n'a aucune influence sur la **Variable Y**.

C'est-à-dire que les deux stades végétatifs de la plante n'entraînent pas une variation de l'activité de piégeage du radical DPPH.

H_0^B : Le **facteur B** n'a aucune influence sur la **variable Y**.

C'est-à-dire que les différentes concentrations de l'extrait éthanolique n'entraînent pas une variation de l'activité de piégeage du radical DPPH.

H_0^{A*B} : Il n'y a aucune **interaction** entre les facteurs **A** et **B**.

Analyse de la variance (ANOVA) :

Tableau 27 : Tests des effets inter-sujets Variable dépendante: Activité de piégeage du radical DPPH

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Modèle corrigé	49232.245	21	2344.393	2651.033	.000
Constante	81292.303	1	81292.303	91925.114	.000

A	1265.908	1	1265.908	1431.485	.000
B	46543.052	10	4654.305	5263.076	.000
A*B	1423.285	10	142.328	160.945	.000
Erreur	38.911		44	.884	
Total			130563.459	66	
Total corrigé			49271.155	65	

a R deux = .999 (R deux ajusté = .999)

D'après les résultats obtenus (Tableau 26) les valeurs de signification sont nulles toutes, par conséquent, les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{A*B} sont rejetées :

Le facteur A influe : le stade végétatif de la plante dans lequel on isole l'extrait éthanolique a un effet significatif sur l'activité de piégeage du radical DPPH.

Le facteur B influe : la concentration de l'extrait éthanolique a un effet significatif sur l'activité de piégeage du radical DPPH.

Le facteur A*B influe : il y a une interaction entre le stade végétatif de la plante dans lequel on isole l'extrait éthanolique et la concentration de celui-ci, qui a un effet significatif sur l'activité de piégeage du radical DPPH.

La figure suivante montre que l'activité de piégeage du radical DPPH est corrélée avec la concentration de l'extrait. On note également qu'au stade adulte l'activité est meilleure

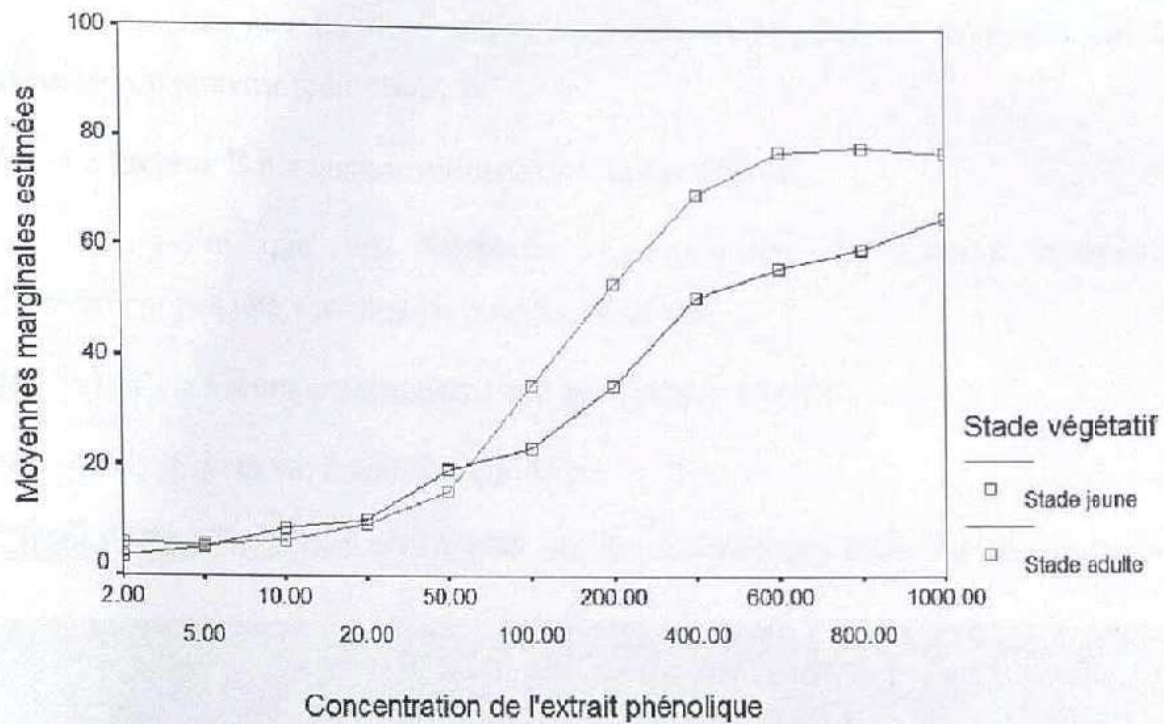


Figure 38 : variation de l'activité de piégeage du radical DPPH suivant le stade de la plante et la concentration de l'extrait.

1.2.2. Influence du stade végétatif de la plante et de la concentration de l'huile essentielle sur le pouvoir réducteur :

❖ **L'essai :**

Variable Y : Pouvoir réducteur.

Facteur A : Stade végétatif de la plante dans lequel on isole l'extrait éthanolique, avec deux possibilités : *stade jeune* et *stade adulte* (floraison)

Facteur B : Concentration de l'extrait éthanolique qui varie de 100 à 1000 mg/l.

❖ **Les hypothèses H à tester :**

H_0^A : Le facteur A n'a aucune influence sur la Variable Y.

C'est-à-dire que les deux stades végétatifs de la plante n'entraînent pas une variation du pouvoir réducteur.

H_0^B : Le facteur B n'a aucune influence sur la variable Y.

C'est-à-dire que les différentes concentrations de l'extrait éthanolique n'entraînent pas une variation du pouvoir réducteur.

H_0^{A*B} : Il n'y a aucune interaction entre les facteurs A et B.

❖ Analyse de la variance (ANOVA) :

Tableau 28 : Tests des effets inter-sujets Variable dépendante: Pouvoir réducteur

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	signification
Modele corrigé	11.105	11	1.010	2588.603	.000
Constante	26.378	1	26.378	67637.169	.000
A	.957	1	.957	2454.195	.000
B	9.799	5	1.960	5024.980	.000
A*B	.349	5	6.985E-02	179.108	.000
Erreur	9.360E-03	24	3900E -04		
Total	37.493	36			
Total corrigé	11.114	35			

D'après les résultats obtenus (Tableau 27) les valeurs de signification sont nulles toutes, par conséquent, les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{A*B} sont rejetées, ce qui entraîne:

Le facteur A influe : le stade végétatif de la plante dans lequel on isole l'extrait éthanolique a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

Le facteur B influe : la concentration de l'extrait éthanolique a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

Le facteur A*B influe : il y a une interaction entre le stade végétatif de la plante dans lequel on isole l'extrait éthanolique et la concentration de celle-ci, qui a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

La figure suivante montre d'une part qu'au stade adulte le pouvoir réducteur est meilleur et d'autre part que ce pouvoir est corrélé positivement avec la concentration de l'extrait : plus la concentration de l'extrait augmente, plus l'activité sera grande.

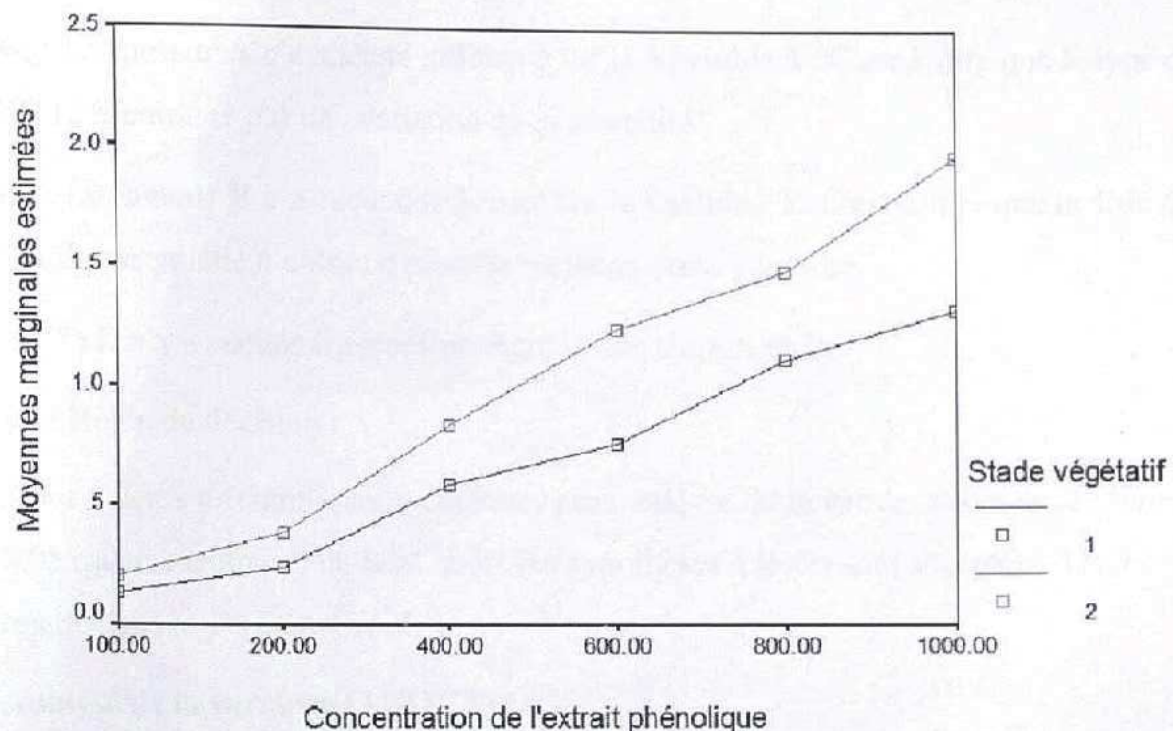


Figure 39 : Variation du pouvoir réducteur suivant le stade de la plante et la concentration de l'extrait phénolique.

2. Activité insecticide des huiles essentielles :

2.1. Test de contact sur *Sitophilus oryzae* :

❖ **L'essai :** On vise là à mesurer l'influence du type et de la dose de l'huile essentielle sur la mortalité des individus d'insecte traités par contact :

Variable Y : Mortalité des insectes par contact.

Facteur A : La plante à partir de laquelle on a extrait l'huile essentielle avec deux possibilités : *la férule et le thym*.

Facteur B : Dose de l'huile essentielle qui varie de 0.063 à 0.503 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ pour la férule et de 0.094 à 0.754 pour le thym.

❖ **Les hypothèses H à tester :**

H_0^A : Le **facteur A** n'a aucune influence sur la **Variable Y**. C'est-à-dire que le type de l'H.E. n'entraîne pas une variation de la mortalité

H_0^B : Le **facteur B** n'a aucune influence sur la **variable Y**. C'est-à-dire que la dose de l'huile essentielle n'entraîne pas une variation de la mortalité.

H_0^{A*B} : Il n'y a aucune **interaction** entre les facteurs **A et B**.

❖ **Règle de décision :**

Si les valeurs de signification obtenues par l'analyse de la variance sont supérieures à 0.05 (qui est le niveau du test), alors les hypothèses à tester sont acceptées. On les rejette dans le cas contraire.

Analyse de la variance (ANOVA) :

Tableau 29 : Tests des effets inter-sujets Variable dépendante: Mortalité par contact

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Modèle corrigé	1385.719	7	197.960	35.789	.000
Constante	4394.531	1	4394.531	794.492	.000
A	.000	0	.	.	.
B	943.187	6	157.198	28.420	.000
A * B	.000	0	.	.	.
Erreur	132.750	24		5.531	
Total		5913.000		32	
Total corrigé		1518.469		31	

a R deux = .913 (R deux ajusté = .887)

D'après les résultats obtenus (Tableau 29), la valeur de signification est nulle pour le facteur B, par conséquent, l'hypothèse est rejetée, on accepte le contraire :

Le facteur B influe : la concentration de chaque l'huile essentielle a un effet significatif sur la mortalité des insectes par contact.

On ne peut pas connaître sur l'influence du facteur A (type de l'huile essentielle), et sur l'influence du facteur A*B (interaction type et dose de l'H.E.) sur la mortalité, car nous n'avons pas utilisé la même fourchette de doses pour les deux H.E.

La figure suivante met en évidence la corrélation positive de la mortalité des insectes avec la dose de l'huile essentielle utilisée lors du traitement.

On remarque aussi que l'H.E. du thym entraîne plus de mortalité que l'H.E. de la férule

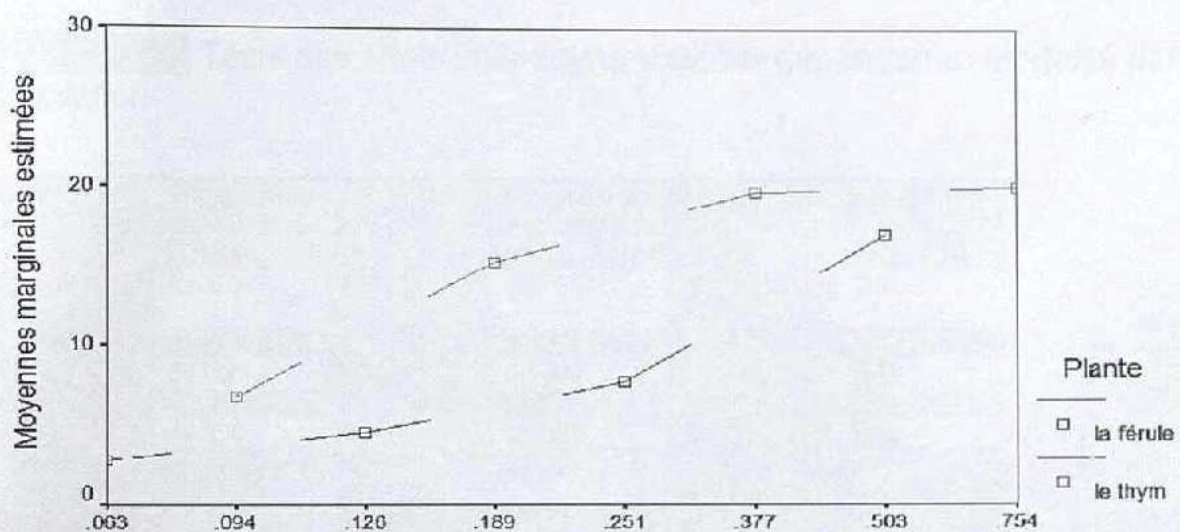


Figure 40 : Variation de la mortalité des insectes suivant le type et la dose de l'H.E.

2.2. Évaluations de la toxicité des huiles essentielles par inhalation sur *Sitophilus oryzae* :

❖ **L'essai** : On vise là à mesurer l'influence du type et de la dose de l'huile essentielle sur la mortalité des individus d'insecte traités par inhalation:

Variable Y : Mortalité des insectes par inhalation.

Facteur A : La plante à partir de laquelle on a extrait l'huile essentielle avec deux possibilités : *la férule* et *le thym*.

Facteur B : Durée du traitement qui varie de 24 à 192 heures.

❖ **Les hypothèses H à tester :**

H_0^A : Le **facteur A** n'a aucune influence sur la **Variable Y**. C'est-à-dire que le type de l'H.E. n'entraîne pas une variation de la mortalité

H_0^B : Le **facteur B** n'a aucune influence sur la **variable Y**. C'est-à-dire que la durée du traitement n'entraîne pas une variation de la mortalité.

H_0^{A*B} : Il n'y a aucune **interaction** entre les facteurs **A et B**.

❖ **Analyse de la variance (ANOVA) :**

Tableau 30: Tests des effets inter-sujets Variable dépendante: Mortalité par inhalation.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Modèle corrigé	2128.375	7	304.054	133.895	.000
Constante	2145.125	1	2145.125	944.642	.000
A	50.000	1	50.000	22.018	.000
B	1994.125	3	664.708	292.716	.000
A * B	84.250	3	28.083	12.367	.000
Erreur	54.500	24	2.271		
Total		4328.000		32	
Total corrigé		2182.875		31	

a R deux = .975 (R deux ajusté = .968)

D'après les résultats obtenus (Tableau 30), toutes les valeurs de signification sont nulles, par conséquent, les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{A*B} sont rejetées :

Le facteur A influe : le type de l'huile essentielle a un effet significatif sur la mortalité des insectes par inhalation.

Le facteur B influe : la durée du traitement a un effet significatif sur la mortalité des insectes par inhalation.

Le facteur A*B influe : il y a une interaction entre le type de l'huile essentielle et durée du traitement, qui a un effet significatif sur la mortalité des insectes par inhalation.

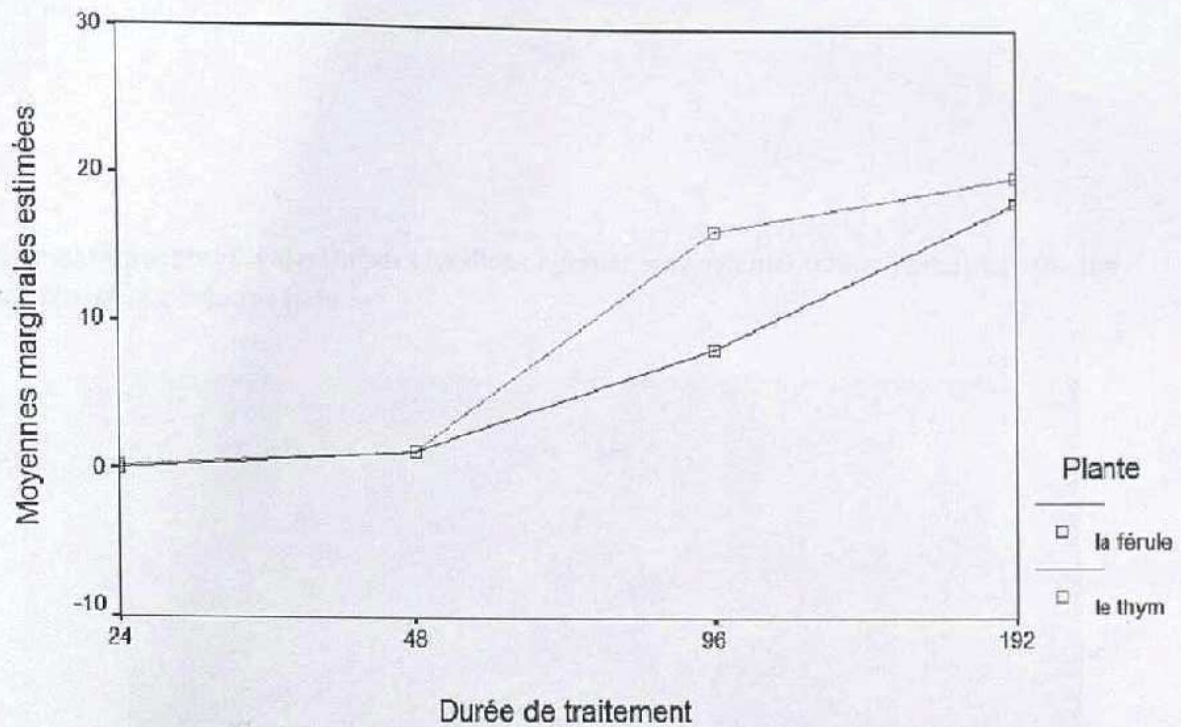


Figure 41 : Variation de la mortalité des insectes suivant le type de et la dose de l'H.E.

De la figure 45 on tire que la mortalité des insectes par inhalation est corrélée positivement avec la durée de l'exposition aux huiles essentielles. L'effet du type de l'huile essentielle est aussi illustré, en effet on remarque que le l'H.E. du thym possède une activité insecticide plus importante que l'H.E. de la férule.

Chromatogramme GC des H.E. des feuilles de *ferula vesceritensis* (stade jeune) sur colonne apolaire et sur colonne polaire

