

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
يلالي بونعامة خميس مليانة
Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana
Faculté des sciences Science de la Technologie
Département de science de la Matière



Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention d'un
diplôme de Master

Spécialité: Chimie pharmaceutique

THEME

**Activité antibactérienne, antioxydante et anti-insectes
des huiles essentielles d'eucalyptus, laurier de la région
d'Ain Defla**

Soutenu le : 23/06/2018

Présenté par :
Melle : CHIBAH SAIDA
Melle : DJOUAHER FATIMA

Membre du jury :

| | | | |
|----------------|----------------|-------------|--------------------------|
| Présidente : | M _r | HAMMOUDI.M | MCB. UNV. Khemis Miliana |
| Examinatrice : | M _m | HARICHAN.A | MCB. UNV. Khemis Miliana |
| Promotrice : | M _m | HALIAMI.F/Z | MCB .UNV. Khemis Miliana |

Année Universitaire : 2017/2018



Remerciements

Avant toute chose, nous tiens à remercier « Allah » qui nous avons données la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

*Nous tiens à remercier, nous encadreur M^{me} **Halaimi**, maitre de conférences à l'université de Djilali Bounaama pour le privilège et la confiance qu'elle nous accordés durant l'étude pratique, et de nous avoir accepté de diriger ce travail avec compétence, pour sa disponibilité, son aide, sa patience, ainsi que pour ses précieuse conseils, jeunepeux, madame, que sincèrement vous exprimer mon respect et ma gratitude.*

*Nous remerciments vant à nous enseignant M^{me} les jurys
HAMMOUDI , Harichane*

Dàvois accepté d'examiner ce modeste travail.

Ainsi nous adressons, nous sincères remerciments aux tous les enseignants du département de science de technologie, les chefs et les techniciennes de laboratoire de génie de procédé et de Lebeau d'analyse de l'université de Djilali Bounaama et surtout M^{me} Mallale et tibusé.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail a :

Les deux personnes, les plus chers au monde que je ne remercierais jamais assez : leurs aides, l'encouragement, soutiens, sacrifice et leur patience pendant toute ma vie : mes chères parent :

KUIDER et AICHA.

Mes chères sœurs et Mes chers frères, leur époux et leur enfant surtout ISLAM ; ABDALHAK ; HAITHAM ; RÉTADJ.

Mes oncles et toutes paternel et maternels et leur enfants.

Man très cher marié IBRAHIME pour son aide et son encouragement et à toute sa famille.

*Mes très chère amies surtout : FAIMA ; AHLAM ; CHRIFA ;
NAIMA ; NASIRA.*

Ma promotrice M^e HALAIMI F/z. pour sa sincère reconnaissance pour m'avoir dirigé dans le travail pour ses précieux conseils, le dévouement, l'orientation, patience et pour ses remarque pertinents et commentaire perspicaces.

Tous les étudiants, enseignants et personnels du département de science de la matière et surtout la spécialité Chimie pharmaceutique.

Toute personne qui me connaît de près ou de loin.

SAIDA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail aux être les plus proches de mon cœur :

mes très cher parent : Djilali et Bakhta.

Ma chère sœur : Mofida ,Mariem.

Et tous mes frères : walid, Toufik, Djilali, Abed kader, Mohamed.

A les : petites Nour imane , Zahra, Abed nour, wissam, Lina ,Amina

A ma grande mère

A mes oncles et mes tantes et sont enfant

A mes chères copines :fatima , Rabiaa, Somia.

A tous la famille Djouaher.

A mes très chères amies : Mofida, Naïma, fatima, Somia.

A ma chère amie, mon binôme Saïda, Et tout qui aime A tout ma

promotion master chimie pharmaceutique 2018-2019

Merci aux longes études pour nous avoir si longuement réunis.

Fatima.

RESUME

Dans notre étude, deux plantes aromatiques (*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis*) provenant de la région de attaf de wilaya Ain Defla ont fait l'objet d'un décryptage physico chimique et biologique de leurs huiles essentielles.

Ces huiles essentielles extraites par hydrodistillation .Le rendement en huile essentielle obtenu par l'hydrodistillation de la plante *Eucalyptus globulus* est de 0,56% et *laurus nobilis* est 0.58 %. Ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Le criblage phytochimique a permis d'identifier :

La capacité des huiles essentielles à inhiber les micro-organismes a été testée sur une quatre des souches bactériennes. L'activité antibactérienne s'est révélée variable selon la nature de la souche et de l'huile essentielle avec une prédominance d'*Eucalyptus* qui a obtenu meilleurs résultats.

Son pouvoir antioxydant a été évalué par un test DPPH. La concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (EC50) est de 257,788 µg/ml pour *Eucalyptus globulus* et 66.884 µg/ml pour *laurier nobilis*. Dans cette étude nous avons pu constater que l'huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *laurier nobilis* a une activité antioxydante considérable.

Etude la pouvoir antisecte a été évalué par un traitement d'inhalation, de huile *Eucalyptus globulus* et *Laurier nobilis* sur l'insecte ravageur de blé en post-récolte *Tribolium castaneum* (Herbst), en évaluant les mortalités les DL₅₀-DL₉₀ et TL₅₀.TL₉₀. Les résultats montrent que les huiles essentielles des deux plantes étudiées ont un effet insecticide et que les mortalités obtenues variant selon les doses, les temps d'observation et les organes de la plante.

Les propriétés biologiques observées seraient liées à la complexité de la composition chimique et la synergie entre eux.

Mots clés : Huiles essentielles, *Laurus nobilis*, *Eucalyptus globulus* CG/MS, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante , Activité anti-insectes.

ABSTRACT

In our study, three aromatic plants (*Eucalyptus globulus* and *Laurus nobilis*) from the Attaf region of the wilaya Ain Defla have been characterized by their physico-chemical and biological properties. The essential oils extracted by steam distillation and hydrodistillation of the plant *Eucalyptus globulus* yielded 0.65% and *Laurus nobilis* 0.58%.

The essential oils were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The phytochemical screening identified

The capacity of the essential oils to inhibit microorganisms was tested on 4 bacterial strains. The antibacterial activity was variable depending on the nature of the strain and essential oils, with a predominance in the bay which obtained the best results.

The antioxidant capacity was evaluated by DPPH tests. The effective concentration that causes a loss of 50% of DPPH activity (EC₅₀) is 257,788 µg/ml for *Eucalyptus globulus* and 66.884 µg/ml for *Laurus nobilis*. In this study we found that the essential oil of *Lippia citriodora* had considerable antioxidant activity.

This study aims to determine the biological activity of two spontaneous plants, *Laurus nobilis* and *Eucalyptus*, on the insect pest of wheat postharvest *Tribolium castaneum* (Herbst) by assessing the mortality, LD₅₀ and LD₉₀. The results show that essential oils of both plants studied have an insecticidal effect and that the mortality varies according to the doses, the observation time and the organs of the plant.

Biological properties observed are related to the complexity of the chemical composition and the synergy between them.

Key words: essential oils, *Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis*, GC/MS, antimicrobial activity, antioxidant activity, anti-insect activity

الملخص

تهدف دراستنا إلى التعرف على الخصائص الفيزيوكيميائية والنشاط البيولوجي لزيوت العطرية المستخلصة من *Eucalyptus globulus* et *laurier nobilis* تنمو بمنطقة العطاف ولاية عين الدفلى .

بطريقة التدريب تم تحليلها الكيميائي بواسطة التقطير المائي حيث ان مردود هذه العملية
0.56% d'*Eucalyptus globulus* 0.58% de *laurus nobilis*

كذلك تم تحليلها من قبل الكروماتوغرافي الغازي بقيس الطيف الكتلي . سمح بفصل () مكونا لزيوت المجهرية تم اختباره على 4 سلالة بكتيرية اوضح تباين في النتائج حسب طبيعة البكتيريا لك الزيت الطيار مع نشاط واضح الاكاليبتوس عبرت عنه النتائج.

وقد تم تقييم قدرتها المضادة للأكسدة عن طريق اختبار DPPH , بتحديد التركيز الفعال الذي يتسبب في فقدا 50 %
DPPH E S 257, 788 µg/ml للأكاليبتوس *globulus* 66.884 µg/ml *nobilis*

خلال هذه الدراسة وصلنا الى أن الزيوت الأساسية قد قامت بنشاط

يتم دراسة مضادات الحشرات باستعمال الزيوت الاساسية لنبتت لأكاليبتوس و الرند عن طريق المعالجة بالاستنشاق على *Tribolium castaneum* (herbst) وتقدير التركيز والوقت اللازم من اجل قتل 50% 90% من فصيلة هذه الحشرة هرت النتائج أن الزيوت الأساسية لهذه ويتفاوت معدل الوفيات

, الخصائص البيولوجية المختلفة الملاحظة خلال هذا العمل ترجع إلى مدى تعقيد التركيب الكيميائي لزيوت العطرية .
كلمات البحث: الزيوت العطرية , *Laurus nobilis* , *Eucalyptus globulus* , للبكتيريا ,

Liste des abréviations :

Abs : Absorbance.

AFNOR : l'Association Française de Normalisation.

ARP : puissance anti radicalaire.

CPG/SM : chromatographie phase gazeuse couplée avec spectrométrie de masse.

CM : carrée moyenne.

DMSO : diméthylesulfoxyde.

DPPH : (2, 2 diphényle- 1- picryl hydruazul).

DL₅₀ : dose létal pour tuer 50 % populations.

DL₉₀ : dose létal pour tuer 90 % populations.

D1, D2, D3, D4 : Doses de traitement.

EC₅₀ : la concentration effectrice d'échantillon pour réduire 50 de DPPH.

IA : L'indice d'Acide.

IS : L'Indice de Saponification.

IR : l'indice de réfraction.

IS : l'indice de saponification

I : Intensité.

I% : pourcentage d'inhibition.

H(%) : Taux d'humidité exprimé en pourcentage

H.E : l'huile essentielle.

MHE: masse de l'huile essentielle en g.

MmV: messe initiale de matière végétale en g.

OILB : l'organisation internationale de lutte biologique.

Probité : Modèle employé en droit de régression.

R% : Rendement en pourcentage %.

R : répétition

TR : Temps de rétention.

T : Témoin.

μ l : microlitre

x max : longueur d'onde de maximum d'absorption

Liste de figure

| | |
|--|----|
| Figure I.1 : Structure chimique d'isoprène (C ₅ H ₈) n..... | 4 |
| Figure I.2 : Structure Chimiques de quelques composés terpéniques..... | 5 |
| Figure I.3 : Structure Chimique de quelques composés aromatiques..... | 5 |
| Figure I.4 : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle..... | 8 |
| Figure I.5 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante..... | 9 |
| Figure I.6 : Extraction par micro-ondes plus L'hydrodistillation traditionnelle..... | 10 |
| Figure I.7 : Les différents types d'extraction par solvants volatils..... | 11 |
| Figure I.8 : Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne..... | 14 |
| Figure II.1 : <i>Eucalyptus globulus</i> | 17 |
| Figure II.2 : <i>Laurus nobilis</i> L..... | 19 |
| Figure III .1 : Adulte de <i>Tribolium castaneum</i> (<i>Tribolium</i> rouge de la farine)..... | 23 |
| Figure III.2 : Cycle de vie de <i>Tribolium castaneum</i> | 24 |
| Figure IV.1 : Photographie de plantes étudiées..... | 29 |
| Figure IV.2 : Localisation de la zone étudiée..... | 29 |
| Figure IV.3.Diagramme général de la procédure expérimentale..... | 30 |
| Figure IV.4 : Montage d'extraction par hydrodistillation type (Clevenger)..... | 31 |
| Figure IV.5: Papier indicateur de pH | 34 |
| Figure IV.6 : Réfractomètre..... | 35 |
| Figure IV.7 : Appareil de chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la spectrophotométrie de masse | 38 |
| Figure IV.8 : Ensemencement bactérie..... | 40 |
| Figure: IV.9: L'application des disques..... | 41 |
| Figure IV.10: Forme libre et réduite du DPPH..... | 42 |
| Figure IV.11 : Matérielle utilisé pour notre expérience..... | 44 |
| Figure IV.12: Evaluation de la toxicité par le teste d'inhalation..... | 45 |
| Figure IV. 13: Traitement par inhalation de <i>Tribolium Castaneum</i> | 46 |
| Figure V.1 : Rendement en huile essentielle obtenue..... | 49 |
| Figure V.2: Taux d'humidité des plantes | 49 |
| Figure V.3: Cinétique d'extraction de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus et Laurus nobilis</i> L..... | 50 |
| Figure V.4 : Indice de réfraction de H E <i>Laurus nobilis</i> L..... | 53 |
| Figure V.5 : l'indice de réfraction de H.E <i>Eucalyptus</i> | 53 |

| | |
|--|----|
| Figure V.6 : Spectre UV/vis d'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Laurus nobilis</i> L..... | 54 |
| Figure V.7: Profil chromatographique de l'huile essentielle des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L..... | 55 |
| Figure V.8: Composants majoritaire de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> L..... | 57 |
| Figure V.9: Profil chromatographique de l'huile essentielle des feuilles de d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 60 |
| Figure V.10 : Structure chimique des compositions majoritaires d'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 63 |
| Figure V.11 : Zones d'inhibition des HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 64 |
| Figure V.12 : Zones d'inhibition des HE de <i>Laurus nobilis</i> . L..... | 65 |
| Figure V.13: Diagramme de diamètres des zones d'inhibition (mm) de d' <i>Eucalyptus globulus</i> en fonction des concentrations (1/2) (1/4) (1/6) (1/8)..... | 67 |
| Figure V.14: Diagramme de diamètres des zones d'inhibition (mm) de <i>Laurus nobilis</i> L en fonction des concentrations (1/2) (1/4) (1/6) (1/8)..... | 68 |
| Figure V.15 : Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des l'huiles essentielles d' <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Laurus nobilis</i> et de acide scorbiq | 71 |
| Figure V.16 : Efficacité d' <i>Eucalyptus</i> au 5 ^{ème} jour chez les adultes de <i>Tribolium</i> | 73 |
| Figure V.17 : Efficacité de laurier au 5 ^{ème} jour chez les adultes de <i>Tribolium</i> | 74 |
| Figure V.18 : Efficacité de la D ₁ de l'huile d' <i>Eucalyptus</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> | 75 |
| Figure V.19 : Efficacité de la D ₂ de l'huile d' <i>Eucalyptus</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> | 76 |
| Figure V.20 : Efficacité de la D ₃ de l'huile d' <i>Eucalyptus</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> | 77 |
| Figure V.21 : Efficacité de la D ₄ de l'huile d' <i>Eucalyptus</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> | 78 |

| | |
|--|----|
| Figure V.22: Efficacité de la D ₁ de l'huile de laurier sur les adultes de Tribolium castaneum..... | 79 |
| Figure V.23 : Efficacité de la D ₂ de l'huile de Laurier sur les adultes de Tribolium castaneum..... | 80 |
| Figure V.24 : Efficacité de la D ₃ de l'huile de Laurier sur les adultes de Tribolium castaneum..... | 81 |
| Figure V. 25 : Efficacité de la D ₄ de l'huile de Laurier sur les adultes de Tribolium castaneum..... | 82 |

Liste des Tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau II.1 : Classification botanique de <i>Eucalyptus globulus</i> | 18 |
| Tableau II .2 : Classification botanique de <i>Laurus nobilis</i> | 20 |
| Tableau III.1 : Classification classique <i>Tribolium castaneum</i> (Herbst) | 22 |
| Tableau IV.1 : Origines et dates de récolte des plantes..... | 29 |
| Tableau IV.2 : Liste des microorganismes testés..... | 39 |
| Tableau IV.3 : Préparation des dilutions..... | 40 |
| Tableau IV.4 : Transformation des pourcentages en probités..... | 47 |
| Tableau V.1 : Rendement en (%) des huiles essentielles d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Laurus nobilis</i> L..... | 48 |
| Tableau V.2 : Propriétés organoleptique des l'huile essentielles d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Laurus nobilis</i> L..... | 51 |
| Tableau V.3 : Les indices physico-chimiques d'HE d'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Laurus nobilis</i> L..... | 52 |
| Tableau V.4 : Composition chimique de l'Huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> L..... | 56 |
| Tableau V.5 : Composition chimique de l'Huile essentielle de d' <i>Eucalyptus</i> <i>globulus</i> | 58 |
| Tableau V.6 : Composition majoritaires (% 0.5) d'HE (à cinéole) de l'espèce <i>Eucalyptus globulus</i> | 62 |
| Tableau V.7: Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition et le pourcentage d'inhibition d'HE de d' <i>Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis des quatre bactéries..... | 64 |
| Tableau V.8 : Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition et le pourcentage d'inhibition d'HE de <i>Laurus nobilis</i> L. vis-à-vis des quatre bactéries..... | 65 |
| Tableau V.9 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés..... | 66 |
| Tableau V.10 : Transcription des diamètres d'inhibition des dilutions huile essentielle de plante <i>Eucalyptus</i> | 67 |
| Tableau V.11 : Transcription des diamètres d'inhibition des dilutions huile essentielle de plante Laurier..... | 68 |
| Tableau V. 12 : Pourcentage d'inhibition (I%) d'huile d' <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Laurus</i> <i>nobilis</i> et de acide ascorbique..... | 70 |
| Tableau V.13 : Logarithme décimaux des doses de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus</i> et probités des taux de mortalité cumulées au 5 ^{ème} jour chez les adultes de <i>Tribolium</i> <i>castaneum</i> | 73 |

| | |
|---|----|
| Tableau V.14 : Logarithme décimaux des doses de l'huile essentielle de Laurier et probités des taux de mortalité cumulées au 5 ^{ème} jour chez les adultes de Tribolium castaneum..... | 74 |
| Tableau V.15 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D1 de l'huile d'Eucalyptus chez les adultes de Tribolium castaneum. | 75 |
| Tableau V.16 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D2 de l'huile d'Eucalyptus chez les adultes de Tribolium castaneum. | 76 |
| Tableau V.17 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D3 de l'huile d'Eucalyptus chez les adultes de Tribolium castaneum. | 77 |
| Tableau V.18 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D4 de l'huile d'Eucalyptus chez les adultes de Tribolium castaneum. | 78 |
| Tableau V.19 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D1 de l'huile du laurier chez les adultes de Tribolium castaneum. | 79 |
| Tableau V.20 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D2 de l'huile de laurier chez les adultes de Tribolium castaneum. | 80 |
| Tableau V.21 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D3 de l'huile de Laurier chez les adultes de Tribolium castaneum. | 81 |
| Tableau V.22 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D4 de l'huile de Laurier chez les adultes de Tribolium castaneum | 82 |

Sommaire

| | | |
|-------------|---|----------|
| I. | REMERCIEMENTS | |
| II. | DIDICACE | |
| III. | RESUME | |
| IV. | LISTE DES ABREVIATIONS | |
| V. | LISTE DES FIGURES | |
| VI. | LISTE DES TABLEAUX | |
| VII. | SOMMAIRE | |
| | Introduction générale..... | 1 |
| | Chapitre I : Généralités sur l'huile essentielle | |
| I.1. | Définition d'huiles essentielles | 3 |
| I.2 | Critères de détermination la qualité des huiles essentielles..... | 3 |
| I.3. | Localisation et rôles des huiles essentielles chez végétaux..... | 4 |
| I.4. | Composition chimique des huiles essentielles | 4 |
| I.5 | Facteurs influençant la composition chimique..... | 6 |
| I.6 | Propriétés physico-chimique des huiles essentielles..... | 6 |
| I.7. | Conservation des huiles essentielles..... | 7 |
| I.8. | Méthodes d'extraction des huiles essentielles..... | 7 |
| I.9. | Toxicité des huiles essentielles..... | 12 |
| I.10. | Les activités biologique d'huiles essentielles..... | 12 |
| | Chapitre II : présentation les plantes étudiées | |
| II.1. | Description Botanique de' Eucalyptus globulus)..... | 16 |

| | |
|---|----|
| II. 2. Origine et distribution l'Eucalyptus..... | 17 |
| II.3. Classification botanique..... | 18 |
| II.4. Composition chimique..... | 18 |
| II.5. Usage traditionnel | 18 |
| II.6. Description Botanique Laurier (LaurusNobilis L)..... | 19 |
| II.7. Origine et distribution de la plante..... | 19 |
| II.8. Classification botanique..... | 20 |
| II.9.Composition chimique..... | 20 |
| II.10.Usage traditionnel de laurier (laurus nobilis.L)..... | 20 |

Chapitre III : Présentation l'insecte étudiée

| | |
|--|----|
| III.1. Description de l'adulte de Triboliumcastaneum (Herbst)..... | 22 |
| III.2. Origine et répartition..... | 22 |
| III.3. Régime alimentaire..... | 22 |
| III.4. Cycle de vie de Tribolium castaneum..... | 23 |
| III.5 Méthode de lutte les insectes..... | 25 |
| III.5.1. La lutte préventive..... | 24 |
| III .5.2. Lutte curative | 24 |
| III.6 La relation entre l'insecte et l'huile essentielle..... | 26 |

Chapitre IV : Matériels et méthodes

| | |
|---|----|
| IV.1. Préparation du matériel végétal..... | 28 |
| IV.2. Localisation de la zone étudiée..... | 29 |
| IV.3. Extraction des huiles essentielles..... | 30 |

| | |
|---|----|
| IV.3.1. Détermination du taux d'humidité du matériel végétal..... | 31 |
| IV.3.2. Détermination des rendements en huiles essentielles..... | 32 |
| IV.3.3. Etude de la cinétique d'extraction..... | 32 |
| IV.3.4 Caractéristiques des huiles essentielles..... | 33 |
| IV.3.4.1. Caractéristiques organoleptiques..... | 33 |
| IV.3.4.2 Analyses physico-chimiques d'huiles essentielles..... | 33 |
| IV.3.5. Tests analyses..... | 37 |
| IV.3.5. 1 Analyse de la composition chimique de l'HE par (UV/Vis)..... | 37 |
| IV.3.5.2. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles par CG/MS..... | 38 |
| IV.3.6 Activités biologiques..... | 38 |
| IV.3.6.1 Détermination de l'activité antibactérienne d'HE <i>Eucalyptus</i> (globulus), Laurier (<i>Laurus Nobilis</i> L)..... | 38 |
| IV.3.6.2 Activité antioxydant (méthode de DPPH)..... | 41 |
| IV.3.6.3. Evaluation de la toxicité des huiles essentielle des <i>Eucalyptus</i> et de laurier par inhalation..... | 43 |
| IV.6.3.1. Calcul des doses létales et temps létaux (DL_{50} ; DL_{90} ; TL_{50} et TL_{90}).... | 47 |

Chapitre V : Résultats et discussion

| | |
|---|----|
| V.1. Rendement d'extraction d'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Laurus nobilis</i> L..... | 48 |
| V.2. Humidité de la matière végétale..... | 49 |
| V.3 Etude de la cinétique d'extraction d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Laurus nobilis</i> L..... | 50 |
| V.4. Caractères Organoleptiques d'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Laurus nobilis</i> L..... | 50 |
| V.5. Propriétés physico-chimique d'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Laurus nobilis</i> L..... | 52 |

| | |
|--|----|
| V.6. Spectrophotométrie d'absorption dans l'UV/ visible..... | 53 |
| V.7. Analyse des huiles essentielles par GC/MS | 54 |
| V.8. Etude de l'activité antibactérienne..... | 63 |
| IV.8.1. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne..... | 63 |
| V.9. Activité antioxydant | 69 |
| V.9.1 Teste de DPPH | 69 |
| V.9.2. Calcul du pourcentage d'inhibition (I%) | 70 |
| V.9.3. Calcule d'IC ₅₀ | 70 |
| V.10. L'activité insecticide..... | 72 |
| V.10.1. Calcule des DL ₅₀ et DL ₉₀ | 72 |
| V.10.2. Calcule la TL ₅₀ et TL ₉₀ (Traitement par inhalation)..... | 75 |
| Conclusion..... | 84 |
| Référence- Bibilographique | |

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes aromatiques et médicinales représentent une source inépuisable de remèdes traditionnels et efficaces grâce aux principes actifs qu'elles contiennent : Alcaloïdes, flavonoïdes, hétérosides, saponosides, quinones, vitamines,...et huiles essentielles [1].

La plupart de ces plantes sont bien connues et traditionnellement utilisées dans le monde entier. en effet, les huiles essentielles , principes actifs issus du métabolisme secondaire des plantes médicinales, ont été utilisées depuis l'antiquité et sont largement employées de nos jours, pour leur propriétés biologique (antimicrobienne, antioxydant, analgésique, anti-inflammatoire, anti-cancérogène, antiparasitaire, anti-insecticide), [2] ;[3]... et leurs applications dans de multiples et diverses industries :alimentation ,cosmétique, parfumerie et pharmacie [4] ;[5] .

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes d'oxydations et de la résistance microbienne. Dans ce but l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à caractère antimicrobien et antioxydant [6].

Parmi les plantes aromatiques, Eucalyptus globulus et laurier nobilis ont plusieurs utilisations (culinaire, pharmaceutique, etc.). Une recherche dans la littérature scientifique indique qu'il y a peu de rapports d'études sur les caractérisations physico-chimiques et les propriétés biologiques de l'huile essentielle.

Extraite Eucalyptus globules et laurier nobilis. Dans ce contexte, cette étude a été menée pour évaluer les activités antioxydant, antimicrobienne et anti insecticide de l'huile essentielle extraites des plantes étudiées en vue de la proposer comme conservateur dans l'industrie agroalimentaire.

L'objectif pour suivi est de réaliser une étude comparative de L'HE des feuilles et les tiges de Eucalyptus globulus et laurier nobilis extrait par HD(hydro-distillation) ,en termes de cinétique d'extraction, de rendement ,de propriétés physico-chimiques, et d'activités antimicrobienne ,antioxydante et insecticide.

Notre travail est réparti en deux parties :

Introduction générale

- ✓ La première partie est relative à l'étude bibliographique des plantes ; des huiles essentielles et l'insecte.
- ✓ La deuxième partie représente la partie expérimentale où nous présenterons les techniques utilisées :
 - Extraction des huiles essentielles des Eucalyptus globulus et laurier nobilis par l'hydrodistillation.
 - Détermination de quelques caractéristiques physico-chimiques, organoleptiques des huiles essentielles.
 - Le deuxième axe consiste à déterminer l'effet : antibactérien, antioxydant et insecticide des huiles essentielles.

Enfin les résultats obtenus des caractéristiques physico chimiques des huiles essentielles et leurs activités antibactériennes, antioxydants et anti-insecticide sont interprétés à la lumière de la littérature. Le travail est clôturé par une conclusion et des perspectives.

Chapitre I

**Généralités sur l'huile
essentielle**

I.1. Définition d'huiles essentielles

Le nom « huile essentielle » a été conçu empiriquement. Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances. Cependant, le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante [7], [8].

Les huiles essentielles sont des substances huileuses mais sans corps gras, souvent liquides, volatiles, d'odeur et de saveur généralement forte et souvent colorées. Elles sont extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatique par les méthodes de distillation ou par d'autres méthodes[9],[10],[11].

I.2. Critères de détermination la qualité des huiles essentielles

A rapporté que les critères définissent la qualité des huiles dépendent de plusieurs facteurs pouvant être résumés comme suit :

- ❖ La sélection de plante qui est tributaire du genre et de l'espèce botanique.
- ❖ La chémotype (chimio type) représentant les différents panels de molécules chimiques que des plantes de la même espèce peuvent produire si elles sont placées dans des conditions de culture différentes, le chémotype dépend de l'ensoleillement, de la température, de l'humidité, de la nature du sol, de la pression atmosphérique et de la photopériode.
- ❖ La partie de la plante considérée pour l'extraction est déterminante pour la qualité de l'huile. En effet, les différentes parties d'une plante ne possèdent pas un équipement enzymatique uniforme, ce qui entraîne une différence de composition dans les constituants produits. Il est donc impératif de préciser la partie considérée lors de l'extraction de l'HE.
- ❖ La période de récolte : la récolte doit se faire au moment où les principes actifs les plus intéressants produits par la plante sont à leur concentration maximale.
- ❖ La conservation l'HE : elle doit se faire dans des flacons en verre opaque hermétique, dans un endroit frais, à l'abri de la lumière et de la chaleur pour éviter leur oxydation et la polymérisation de leurs composants [12].

I. 3. Localisation et rôle des huiles essentielles chez végétaux

La teneur des plantes en huiles essentielles est généralement faible, de l'ordre de 1% [13]. Les huiles essentielles sont largement répandues chez les végétaux supérieurs. Elle peuvent être stockées dans tous les organes, les sommités fleuries, les feuilles, les rhizomes, les fruits, les écorces et les graines [14].

Les plantes aromatiques produisent des huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante reste inconnu [15].

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservent l'humidité des plantes dans les climats désertiques [16].

Certaines huiles essentielles servent à la défense des plantes contre les herbivores, insectes et micro-organismes [17].

I.4. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des essences est complexe et peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales et le mode d'extraction [18].

Les H.E sont un mélange de constituant qui appartiennent à trois catégories de composée terpéniques, aromatique et diverse [19].

a) Les composés terpéniques

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques. Ce sont des polymères de l'isoprène de formule brute $(C_5H_8)_n$ [19].

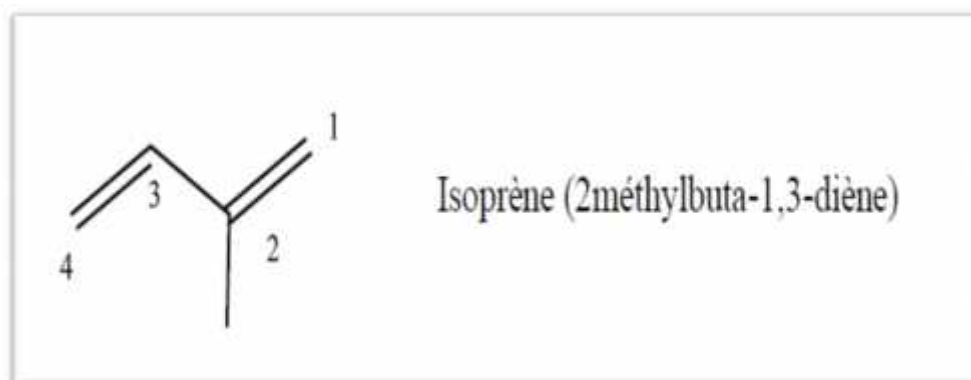


Figure I.1 : Structure chimique d'isoprène (C₅H₈) n [20]

Suivant les valeurs de n, on a les hémiterpènes (n=1), les monoterpènes (n=2) ; Les sesquiterpènes (n=3), les triterpènes (n=6), les tétraerpènes (n=8) et les polyterpènes.

Les constituant des huiles essentielles sont très variés .On y trouve en plus de cétones, des phénols, des oxydes et autres [21].

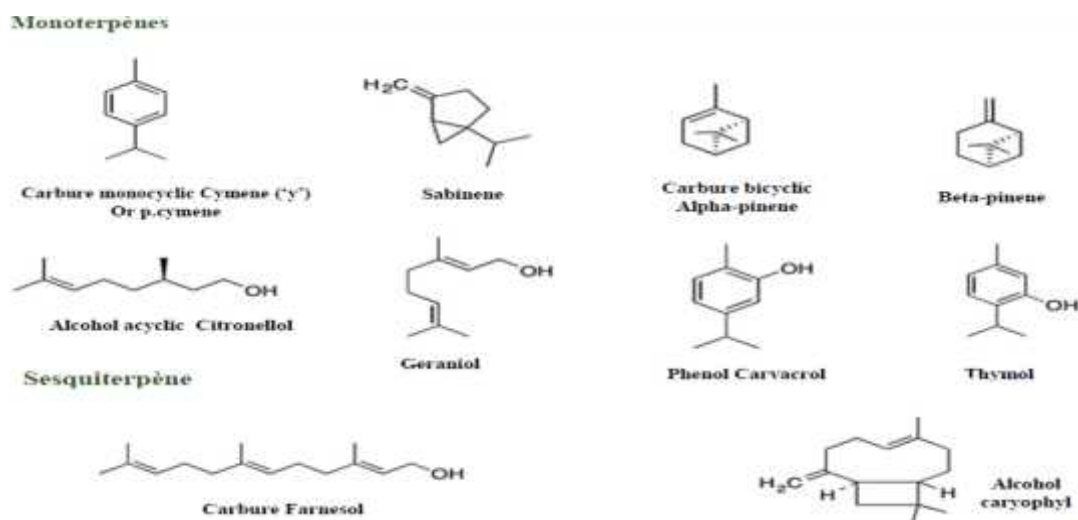


Figure I.2 : Structure Chimiques de quelques composés terpéniques [22].

b) Les composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles .Nous pouvons citer exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou du girofle [23]

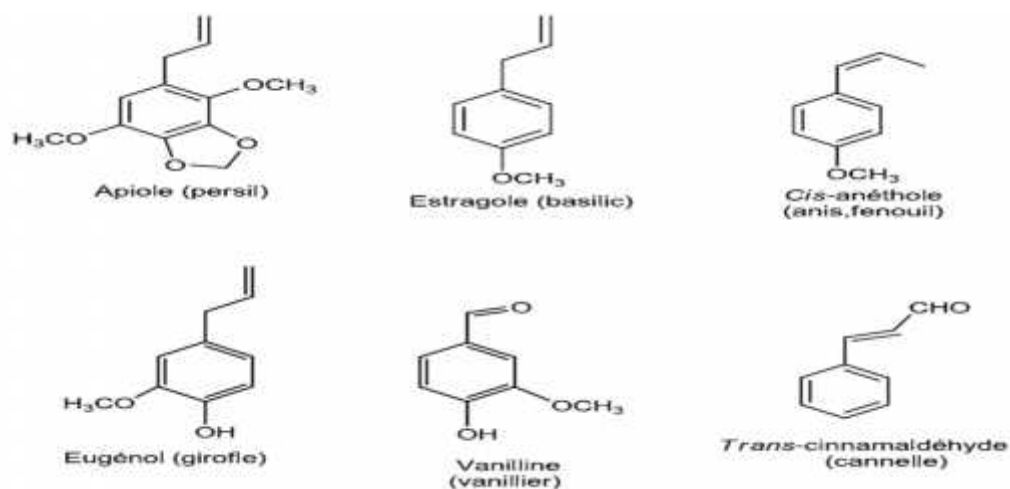


Figure I.3 : Structure Chimique de quelques composés aromatiques [24].

c) Les composés d'origines diverses

Selon le mode de récupération utilisé, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation, carbure (linéaire et ramifiés, saturée ou non), acide (C3 à C10), alcools, aldéhydes, esters acyclique et lactone [25].

I.5. Facteurs influençant la composition chimique

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions: l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes[26];[27];[28].

I.6. Propriétés physico-chimique des huiles essentielles

a) Propriétés physiques

Les huiles essentielles forment un groupe homogène des propriétés physiques que nous résumerons en :

-) Liquides à température ambiante. A base température certaines **H.E** se solidifient.
-) De consistance huileuse mais non grasse.
-) Volatiles (contrairement aux huiles fixes et odorantes). Leur volatilité augmente avec la chaleur.
-) Densité inférieure à celle de l'eau sauf celle de cannelles, sassafras, girofle.
-) Rarement colorées.
-) Solubles dans l'alcool jusqu'à concurrence de 5 , les solvants organique apolaires, les corps gras.
-) Insoluble dans l'eau [29]

b) Propriétés chimiques

On détermine essentiellement l'indice d'acide, d'ester, de carbonyle (aldéhyde) , ainsi que le dosage de quelques majoritaires de huiles essentielles , ajouter à ces caractéristiques , l'examen olfactif qui est très important.

Néanmoins la détermination de ces indices physico-chimique est généralement insuffisante pour une étude analytique approfondie des huiles essentielles pour cela, le recours

aux techniques plus puissantes et fréquentes telle la chromatographie en phase gazeuse et liquide, la résonance magnétique nucléaire et des couplages du genre C.G/S.M semblent être nécessaire [30].

II.7. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles doivent être conservées correctement pour préserver leur qualité. Avec le temps, elles s'oxydent, ce phénomène étant amplifié par la chaleur, l'air, la lumière...etc., Il faut les conserver dans un endroit frais, à l'abri de la lumière, dans du verre brun ou de l'aluminium vitrifié. Une essence bien distillée se conserve trois ans au moins [31].

I.8. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières et à la sensibilité considérable de leurs certains constituants. Le choix de méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire et de l'usage de l'extrait.

Les principales méthodes d'extraction sont :

- Hydro-distillation
- L'Entraînement à la vapeur d'eau
- L'hydro-diffusion
- L'expression à froid
- Extraction par solvants
- Extraction par les fluides supercritiques
- Extraction par micro- ondes
- Extraction par Macération (enfleurage à chaud)
- Extraction par Enfleurage

Quel que soit le type d'extraction utilisé, Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origine végétale restent identiques. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation comme cela est illustré dans la figure. Figure (I. 4) [32].

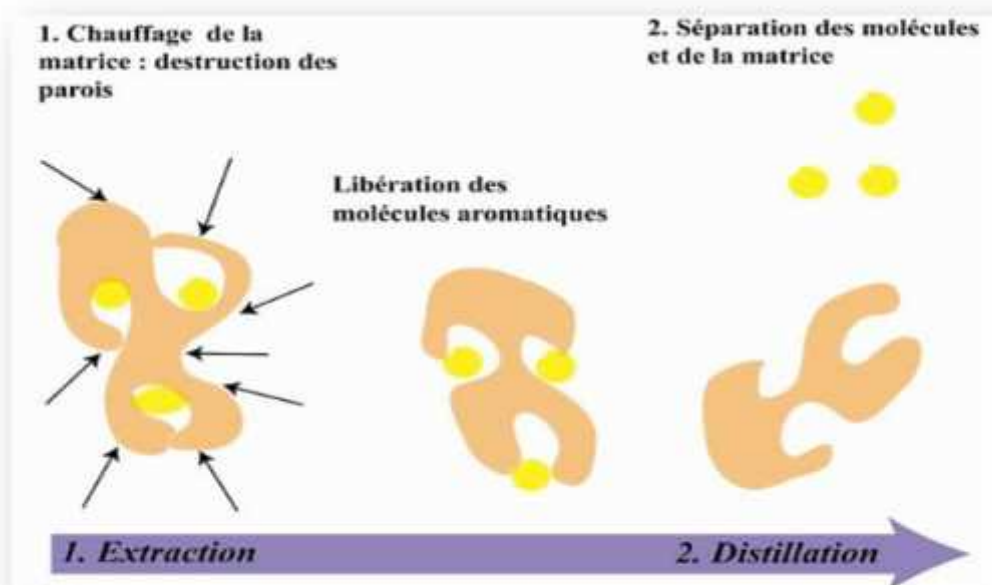


Figure I.4 : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle [33].

a) Extraction par Distillation

Selon [34], il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : L'Hydrodistillation, l'Hydrodiffusion et distillation par entrainement à la vapeur d'eau.

a.1) L'Hydrodistillation (water distillation)

Il s'agit de la méthode la plus simple, et de ce fait la plus anciennement utilisée, la matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau. Placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition, Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'HE se sépare de l'hydrolysât par simple différence de densité, l'HE étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysât [32]

a.2) Hydrodiffusion

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatiles[35].

a.3) Extraction par entrainement à la vapeur d'eau

C'est la méthode la plus utilisée pour l'obtention des composés d'arôme du fait qu'elle produit des substances volatiles facilement analysables par chromatographie en phase gazeuse et exigeant une technologie relativement simple, donc un coût plus bas ainsi qu'une reproductibilité facilement contrôlable [36]. Le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau est basé sur le fait que la plupart des composés odorants contenus dans les végétaux sont susceptibles d'être entraînés par des aérosols de vapeur d'eau. La matière végétale est placée dans un ballon, traversée par un courant de vapeur d'eau ; les principes volatils ; solubles dans l'eau, sont entraînés et après condensés puis séparés du distillat par capillarité [37].

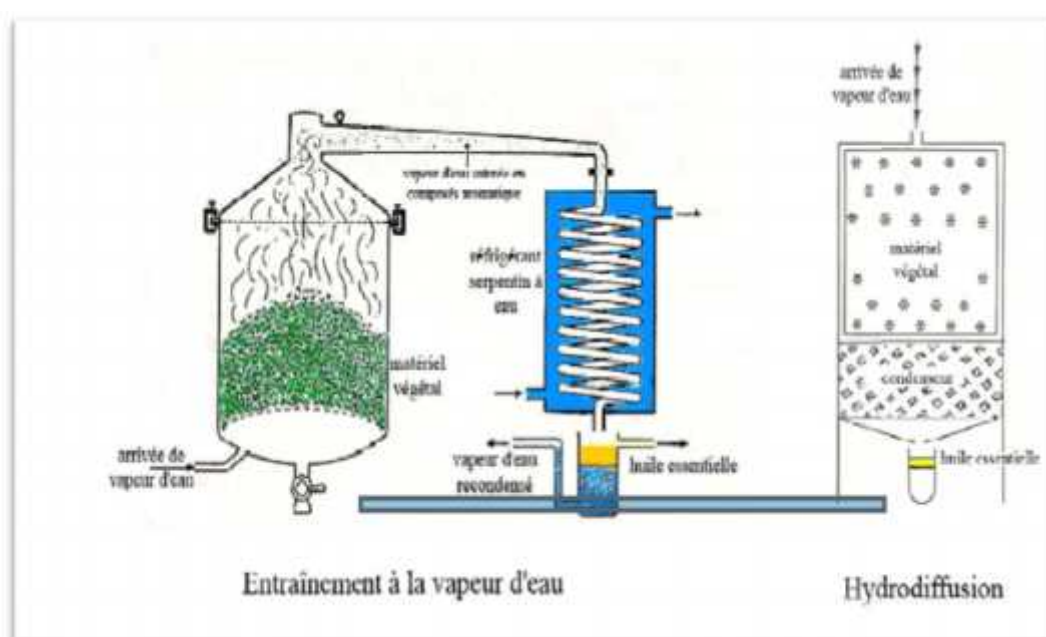


Figure I.5 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et des cendante [38].

b) Extraction par Expression à froid

Cette technique d'extraction est utilisée pour obtenir des essences d'agrumes contenues dans les zestes. Autrefois, on frottait le fruit manuellement sur les parois garnies de picots d'une écuelle de bois. L'huile ainsi exprimée était recueillie à l'aide d'une éponge. Elle était ensuite soigneusement filtrée. De nos jours, les fruits sont pressés à froid. Ensuite, par centrifugation, on sépare l'huile essentielle du jus de fruit. Cette technique permet d'extraire à faible coût des essences de bonne qualité [39], [40].

c) Extraction assistée par micro-ondes

Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. L'huile essentielle est entraînée dans le mélange isotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée (sans ajout d'eau pour les produits traités en frais). Très rapide et peu consommateur d'énergie, le procédé livre un produit qui, le plus souvent, est de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (temps de travail divisé par 5 à 10 et température plus basse) [40]. De façon caractéristique, les micro-ondes génèrent un chauffage rapide et intense des substances polaires avec une réduction importante dans le temps de réaction, et dans la plupart des cas des rendements élevés [41].

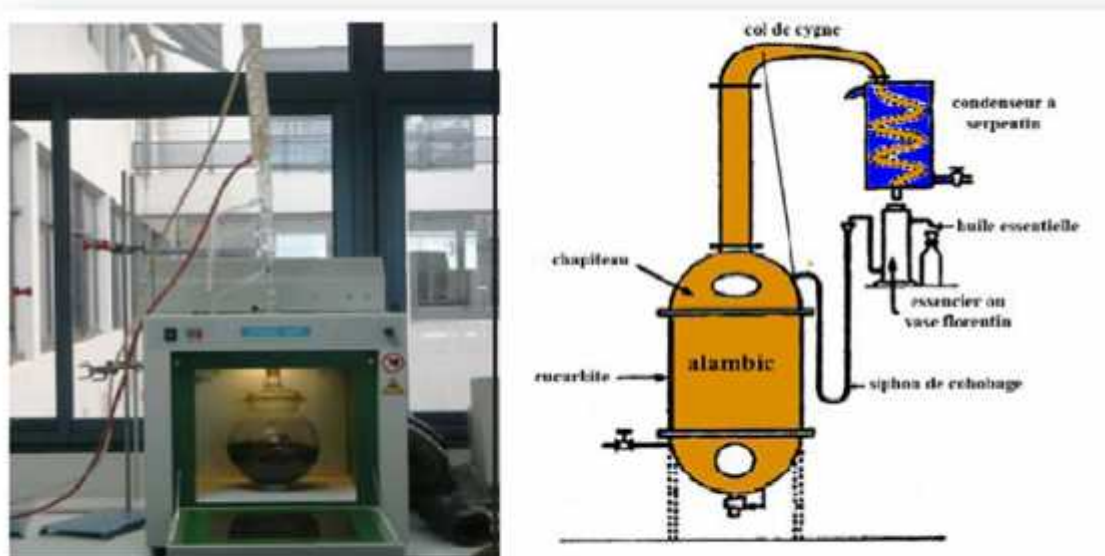


Figure I.6 : Extraction par micro-ondes plus L'hydrodistillation traditionnelle [42] ;[43].

d) Extraction par Enfleurage

Cette méthode n'est presque plus utilisée car elle est très coûteuse. Cette technique permettait de traiter des fleurs fragiles (comme le jasmin) qui conservaient leur odeur après la cueillette mais qui ne supportaient pas la chaleur. Après avoir été soigneusement triées, les fleurs étaient piquées délicatement dans la graisse. Après un certain temps, l'huile essentielle passe des fleurs à la graisse et devient plus facile à récupérer, en lui ajoutant l'alcool, qui sert de vecteur à l'huile essentielle. Finalement, par simple évaporation de l'alcool, on récupère l'huile essentielle seule [39] ;[40].

e) Extraction par Macération (enfleurage à chaud)

A l'inverse de l'enfleurage où l'extraction s'effectuait à température ambiante, la macération utilise les mêmes graisses mais à chaud ; ce qui a pour effet d'augmenter leur pouvoir absorbant. L'extraction est réalisée par immersion des fleurs fraîchement cueillies et constamment renouvelées dans un bac de graisse chaude (50-70 °C) jusqu'à atteindre la saturation. Un épuisement à l'alcool absolu est généralement appliqué sur cette graisse [44].

f) Extraction par solvant volatil

L'extraction se fait à l'aide de solvants organiques volatils dans des appareils appelés extracteur de Soxhlet. En apparence, la division de la matière à extraire facilite le contact avec le solvant (en agrandissant la surface d'échange), permet d'augmenter la charge de l'extracteur et aussi de réduire le rapport du solvant à la charge. Toutefois le tassement entrave la circulation du solvant et l'homogénéisation des solutions ; il faut donc éviter de tasser ou de trop charger l'extracteur (figure I.7).

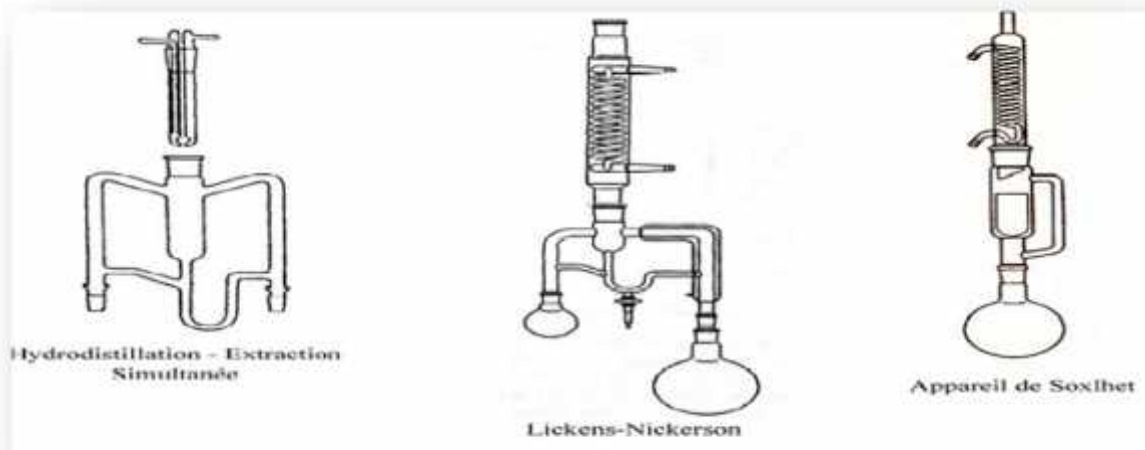


Figure I.7 : Les différents types d'extraction par solvants volatils[45].

L'extraction s'effectue en plusieurs étapes, on lave la matière avec le solvant deux à trois fois. Il semble que la presque totalité des produits odorants passe en solution dès la première extraction. Mais, étant donné que la matière traitée retient une forte proportion de la solution, il est nécessaire de pratiquer des dilutions successives avec de nouvelles charges de solvant (lavages). La matière épuisée retient une proportion importante de solvant. Avec la charge normale de fleurs d'un extracteur statique de mille litres, la quantité varie entre 150 et

180 litres. Il faut donc concentrer la solution en évaporant le solvant qui est recyclé pour d'autres lavages. La récupération du solvant atteint couramment 94 à 96 % de la quantité retenue. La charge de l'extracteur est désolvatée à la vapeur d'eau, puis elle peut être utilisée dans les champs (compostage) [46].

g) Extraction par dioxyde de carbone CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé: il s'agit du CO₂ en phase supercritique. À l'état supercritique, le CO₂ n'est ni liquide, ni gazeux, et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température de mise en œuvre. Les fluides supercritiques comme le CO₂ sont de bons solvants à l'état supercritique, et de mauvais solvants à l'état gazeux.

Cette technique est basée sur le fait que certains gaz, notamment le dioxyde de carbone, dans des conditions de pression dites critiques ou supercritiques présentent un pouvoir de dissolution accru vis-à-vis de divers composés tels que les huiles essentielles, les arômes, les colorants naturels etc..... [46].

I.9 Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines huiles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en Thymol, ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldhyde ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des furacourmarines). Il existe quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancer, c'est le cas par exemple de dérivés d'allyldénzène ou de propenylbenzène comme le safrol, l'estragol, des chercheurs ont mis en évidence l'activité hépatocarcinogénique de ces composés chez les rongeurs [47].

I.10 Les activités biologique d'huiles essentielles

Activités biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergique entre ses composants. Sa valeur tiennent à son intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires. Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont les phénols, les Alcools, les aldéhydes, les cétones et plus rarement les terpènes [48].

a) Activités antioxydant

Le pouvoir antioxydant de ces HE est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les poly phénols qui sont responsables de ce pouvoir [49].

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques [50]. Ce sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit. L'activité antioxydant peut être primaire ou préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, empêchant ainsi la destruction des structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs capables de passer leurs électrons aux Réactifs oxygènes espèces (ROS) et les éliminer [51].

En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène..etc [52].

(Pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation [53].

Quelques travaux ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques [54]. Les effets antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique [55].

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (Pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation [53].

Quelques travaux ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques [54]. Les effets antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique [55].

b) Activités antibactérienne

Les molécules aromatiques possédant l'activité antibactérienne la plus importante sont les Phénols, les terpènes ou terpénoïdes ont aussi des effets contre les bactéries et différents autres germes causant des problèmes dans le domaine médicale et agroalimentaire. Cependant le mécanisme de l'action de ces terpènes n'est pas entièrement compris et qu'il peut être s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles [56].

D'une manière générale, l'action des huiles essentielles 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.

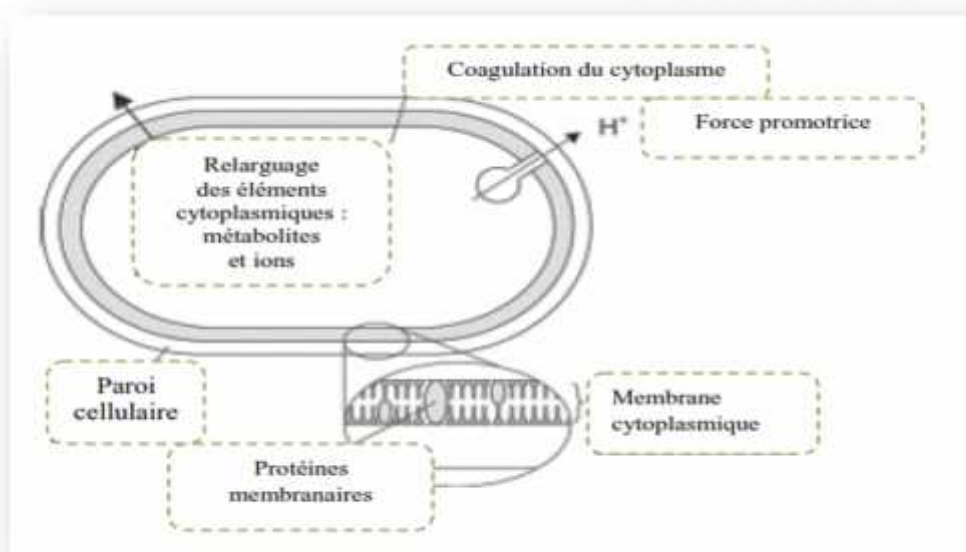


Figure I.8 : Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne [57].

C) Activités Antiseptiques

Les propriétés antiseptiques et désinfectantes sont souvent retrouvées dans les huiles essentielles possédant des fonctions aldéhydes ou des terpènes comme l'huile essentielle d'origan, de thym, et de menthe.....etc

C1) Activités insecticide

Les huiles essentielles des plantes font partie ces dernières années des voies les plus explorées dans la régulation des ravageurs. Leur application dans la protection des stocks a fait l'objet de nombreux travaux. Leur toxicité s'exprime de différentes manières : activités ovocide, larvicide et anti nutritionnelle[58].L'évaluation scientifique des effets insecticides des huiles essentielles des feuilles sèches vis-à-vis des insectes a montré qu'elles ont un large spectre d'action contre les insectes, les nématodes les champignons et les virus[59].D'après[60], l'effet insecticide des huiles essentielles par contact, par ingestion et par fumigation a été bien démontré contre les déprédateurs des denrées entreposée.

Chapitre II

**Présentation les plantes
étudiées**

Les plantes aromatique et médicinale peuvent être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique et agroalimentaire) pour leur propriétés thérapeutique, organoleptique et odorantes ou encore pouvant être utilisées comme source d'isolats pour les héli synthèses .Ces plantes aromatique sont, donc, à l'origine des produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résinesetc) qui se présentent presque toujours comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation [61].L'eucalyptus et laurier comme sont toutes sont toutes les plantes qui auraient une activité pharmacologique pouvant conduire à des employas thérapeutiques, cela grâce à la présence d'un certain nombre de substance actives dont la plus part agissent sur l'organisme humain.

II.1. Description Botanique de' Eucalyptus globulus

Eucalyptus globulus est une arbre aromatique de 30 a100m de haut et plus de 1.5m de diamètre [62], les feuilles jeunes sont opposées, ovales, luisantes et pendantes sur les jeunes rameaux [63]. Les feuilles adultes sont alternes, falciformes, épaisses et coriaces, lancéolées et aigues, de couleur vert foncé [64].les boutons floraux sont blancs.

Il s'épanouissant on printemps et possèdent un calice, en forme de pyramide quadrangulaire, coiffé par un couvercle formé par la corolle qui se soulève à la floraison, laissant apparaitre plusieurs étamines qui se détachent à maturité [65].

Les fleurs sont blanches solitaires ou groupées par 2 où 3 [66]. Elles possèdent 4 sépales rugueux et cireux, soudés en urne [67]. Les fleurs sont bisexuées et régulières. Le fruit est une capsule loculicide et anguleuse renferment plusieurs graines [66]. Les graines sont exalbuminées à ovules anatropes Figure II [66].



Figure II.1 : *Eucalyptus globulus* (photo original).

II.2. Origine et distribution l'Eucalyptus

Les *Eucalyptus* sont de grands arbres dont certaines espèces peuvent atteindre 100 mètres de hauteur, poussant principalement ,en Australie, en Amérique tropicale, région méditerranéenne, l'Afrique subsaharienne, Madagascar, tropicales et tempérées d'Asie, et les îles du Pacifique, notamment de la province de Tasmanie ; *l'Eucalyptus* fut rapidement planté dans les régions subtropicales de l'Asie et du bassin méditerranéen. Possédant une exceptionnelle capacité d'absorber l'eau du sol sur lequel il croît, *l'Eucalyptus* assèche rapidement les marais qu'il colonise. Il élimine ainsi les milieux de reproduction des insectes qui transmettent la malaria, d'où le nom d'« arbre à la fièvre » ou Australien fevertree [68].

II.3. Classification botanique

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure [69], il est regroupé dans le (tableau II.1)

Tableau II.1 : Classification botanique de *Eucalyptus globulus* [69].

| Règne | Plant |
|--------------|-------------------|
| Sous Règne | Tracheobionta |
| Division | Magnoliophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Sous –Classe | Rosidae |
| Ordre | Mytales |
| Familles | Mytacées |
| Genre | <i>Eucalyptus</i> |
| Espèces | <i>Globulus.</i> |

II.4. Composition chimique

Les Principaux composants chimiques des genres l'*Eucalyptus* c'est [70] :

- ✓ Huile essentielle (Oxydes terpéniques : 1,8-cinéole; monoterpènes : alpha-pinène, limonène, gamma-terpinène, paracymène ; Sesquiterpènes : aromadendrène ; Sesquiterpénols : globulol, lédol)
- ✓ Flavonoïdes (des hétérosides de flavones avec les aglycones suivants : quercétine, myricétine, kaempférol et rutine).
- ✓ Tanins.

II.5. Usage traditionnel

L'organisation mondiale de la santé (OMS) reconnaît l'usage traditionnel des feuilles d'*Eucalyptus*, pour soulager la fièvre et les symptômes de l'asthme, Pour traiter l'inflammation des voies respiratoires, de la gorge ou des muqueuses de la bouche (voie interne) ainsi que pour soulager les douleurs rhumatismales (voie externe) [71].

Des essais sur des souris ont cependant permis d'observer que l'*Eucalyptus* exerce une activité antidouleur [71,72]. On pense généralement que cette activité serait attribuable aux propriétés antioxydants de la plante [73].

II.6. Description Botanique Laurier (*Laurus Nobilis* L)

Laurier (*Laurus Nobilis*L) leur nom latin, d'origine ce qui veut dire « toujours vert » allusion au feuillage persistant de la plante [74].

Laurus nobilis L, c'est une arbre ou arbuste aromatique de 2 à 10m de haut. Ses feuilles ecfntières, de 8 à 16 cm de long, sont alternés, coriaces, légèrement ondulées sur les bords, persistantes vert foncé et glacés sur leur face supérieure et plus pale en dessous.

Les fleurs sont jaunes, dioïques (petites fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés), groupées par 4 à 5 en petites ombelles, apparaissent en Mars-Avril. Le fruit est une baie noire, ovoïde de 10 à 15 mm de longueur rassemblant par sa forme et ses dimensions à une petite olive.



Figure II.2 : *Laurus nobilis* L. (photo original).

II.7.Origine et distribution de la plante

Laurus nobilis L'originare du bassin méditerranéen, pousse dans les lieux humides et ombragés, mais également dans les jardins, où elle est cultivée comme condiment [75].

Actuellement, la plante est largement cultivée dans beaucoup de pays comme plante ornementale et pour la production commerciale tels que la Turquie, l'Algérie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux [76,77].

II.8 Classification botanique

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure, il est regroupé dans le tableau I.2.

Tableau II .2 : Classification botanique de *Laurus nobilis* L [78].

| | |
|---------------------------|------------------------|
| Règne | Plantes |
| Sous règne | Plantes vasculaires |
| Embranchement | Spermaphytes |
| Sous embranchement | Angiospermes |
| Classe | Dicotylédones |
| Sous classe | Dialypétales |
| Ordre | Laurales |
| Famille | Lauraceae |
| Genre | <i>Laurus</i> |
| Espèce | <i>Laurusnobilis</i> L |

II.9.Composition chimique

Les feuilles du *Laurus nobilis* renferment plusieurs substances actives dont les huiles essentielles.

Cette dernière représente 1 à 3% du poids sec, elle contient 30 à 70% de 1-8Cinéol (eucalyptol), ainsi que plusieurs composés terpéniques : linalol (8 à 16%), sabinène, géraniol, eugénol 3%, pinène et terpinène[25]

Entre autres, on retrouve dans les feuilles également des alcaloïdesaporphiniques, comme la cryptodorine ou l'actinodaphnine[79], des flavonoïdes polaires (dérivéesglycosylées de quercétine, kaempferol et de catéchine) et apolaires (quatre dérivés acylés de kaempferol) [80;79] et sesquiterpènes lactones. Les feuilles peuvent aussi contenir des tanins.

II.10. Usage traditionnel de laurier noble

Laurus nobilis est l'une des populaires aromatiques utilisées dans le monde entier, elles sont généralement utilisées comme épice et aromatisant en culinaire et en industrie alimentaire ainsi que comme remède important en médecine traditionnelle [78].

Les feuilles sont traditionnellement utilisées dans le traitement symptomatique de troubles digestifs, aussi comme agent antirhumatismale, antiseptique et carminatif [81 ; 82]. Bar la et al, ont dit que les fruits, les fleurs et les feuilles de Laurier peuvent être utilisé comme antimutagène et anticancéreuse [76].

L'huile essentielle obtenue des feuilles de cette plante a été employée pour le soulagement d'hémorroïdes et des douleurs rhumatismales [82]. En outre, l'huile essentielle est employée par l'industrie cosmétique en parfumerie et dans la fabrication des savons. Elle se compte parmi les meilleurs moyens d'éloigner les insectes gênants [83].

Chapitre III

**Présentation l'insecte
étudiée**

Les insectes peuvent causer des pertes importantes en réduisant la qualité et la quantité des produits stockés. D'après l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), les pertes dues aux insectes nuisibles correspondent à 35% de la production agricole mondiale. L'insecte est considéré comme un ravageur secondaire strict [84].

III.1. Description de l'adulte de *Tribolium castaneum* (Herbst)

Tribolium castaneum est un insecte cosmopolite, qui affectionne les farines dans lesquelles il creuse des galeries. Il leur communique une teinte brunâtre et une odeur âcre et rend la panification difficile. Sur les graines d'arachide, il provoque un accroissement notable de la teneur en acide gras libre dans l'huile qui en est extraite et s'attaque au riz, blé, son et farine de riz et de blé, maïs, poivre, gingembre, etc. *Tribolium castaneum* ou *tribolium rouge de la farine* est un petit coléoptère appartenant à la famille des *Tenebrionidae* [85].

L'adulte mesure de 3 à 4 mm, de couleur uniformément brun rougeâtre. Il est étroit, allongé, à bord parallèles, à pronotum presque aussi large que les élytres et non rebordé antérieurement. Contrairement à *Tribolium castaneum* confusum le chaperon ne dépasse pas l'œil latéralement [86]. La larve mesure 6 mm, environ 8 fois plus longue que large, d'un jaune très pâle à maturité, avec latéralement quelques courtes soies jaunes. La capsule céphalique et la face dorsale sont légèrement rougeâtres [87].

Tableau III.1 : Classification classique *Tribolium castaneum* (Herbst) [85]

| | |
|----------------------|-------------------------------------|
| Régne | Animalia |
| Embranchement | Animalia |
| Classe | Insecta |
| Ordre | Coleoptera |
| Famille | tenebrionide |
| Genre | tribolium |
| Espèce | <i>Tribolium castaneum</i> (Herbst) |



Figure III .1 : Adulte de *Tribolium castaneum* (Tribolium rouge de la farine) [85].

III.2. Origine et répartition.

Le tribolium est d'origine Indo-Australienne [88] et est trouvé dans des secteurs tempérés. Mais survivra l'hiver dans les endroits protégés, particulièrement où il y a de la chaleur centrale [89].

III.3. Régime alimentaire

Le tribolium recherche surtout les denrées amylacées pulvérulentes comme la farine [90]. Les adultes sécrète une substance nauséabonde, riche en quinones qui communique au lot infesté une odeur particulièrement désagréable. Ils sont très polyphages. Ce sont des clé trophages secondaires .les larve et l'adulte se nourrissent surtout de brisures .Elles s'attaquent aux grains endommagées et escortent souvent les charançons ou parachèvent leurs dégâts [91].

III.4. Cycle de vie de *Tribolium castaneum*

a) L'œuf

De forme ovoïde et uniforme, les œufs mesurent environ 0.6mm de longueur. Ils sont de couleur blanche au moment de la ponte et recouvertes par une graisse visqueuse qui leur permet de se coller aux particules de nourritures et d'autres débris [92].

b) larve

Dès l'éclosion les larves commencent à se nourrir. On observe de 5 à 8 stades larvaires dans les conditions optimales de développement ; jusqu'à même 13 lorsque les

conditions sont défavorables. la larve est environ huit fois plus longue que large d'un jaune très pale et mûré avec latéralement quelques courtes soies jaunes [93].

C'est le seul stade de croissance. La larve consomme plusieurs fois son propre poids de nourriture et comme son tégument est rigide, elle doit muer périodiquement pour grossir, la découverte d'exuvies dans les céréales, les oléagineux et leurs produits indiquent que des insectes sont ou étaient.

a) La nymphe

C'est l'état évolutif entre l'état larvaire et adulte. C'est le stade de la vie de *Tribolium castaneum* moules caractères secondaires sexuels permettent des distinguer le sexe mâle de la femelle [94], L'état nymphal se considère à partir du jour où l'insecte est immobile et ne s'alimente pas.

b) L'adulte

De couleur brune rougeâtre, il est distingué par divers caractères notamment les trois derniers articles nettement plus gros que les précédents, formant une mesure distincte ; absence de crête au-dessus de l'œil et les yeux ovales plus petits [93]. Le *Tribolium castaneum* (Herbest). Ou *Tribolium* rouge de la farine est un insecte de 3 à 4 mm de long [97].

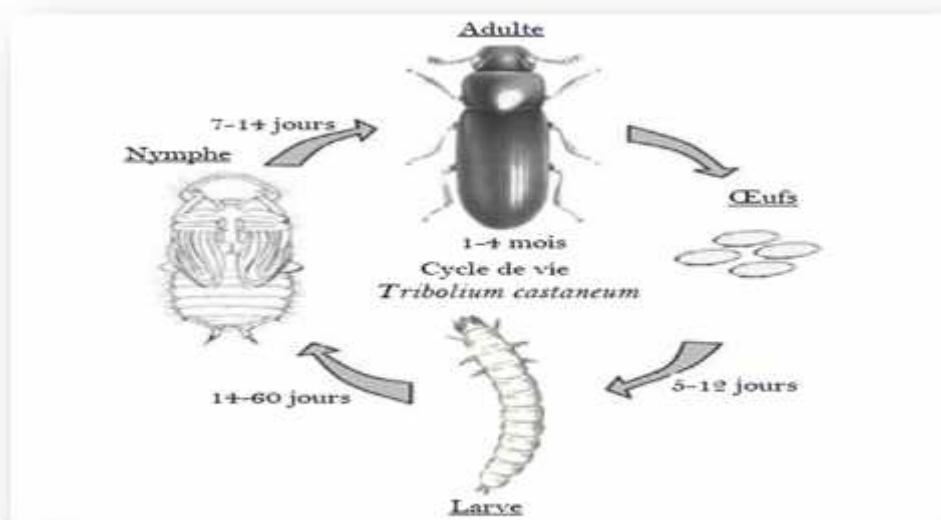


Figure III.2 : Cycle de vie de *Tribolium castaneum* [85].

La larve et l'adulte attaquent les grains endommagés (de préférence le germe).ils escortent souvent les charançons dont ils parachèvent les dégâts ils souillent les farines par leurs excréments et les dépouilles des mues larvaires. La farine devine alors brune et a une odeur désagréable qui peut persister dans les produits transformés. [100].

III .5. Méthode de lutte les insectes

III.5.1. La lutte préventive

La préventive contre les ravageurs des denrées stockées repose sur un ensemble de mesures hygiéniques et chimiques.

Toutefois, les méthodes de lutte physique et chimique ont acquis au cour de la dernière décennie une importance accrue [101].

III .5.2. Lutte curative

Les différents moyens de la lutte préventive sont obligatoires mais ils restent insuffisants. Dans ce cas le recours aux procédés curatifs est indispensable.

Ces procédés interviennent directement contre les insectes en place. Parmi les moyen utilises on cite la lutte physique, la lutte chimique et la lutte biologique.

a) Lutte biologique

La lutte biologique telle qu'elle a été définie en 1971 par l'organisation internationale de lutte biologique (**OILB**) peut être considérée, dans son le plus strict, comme l'utilisation d'organismes vivants ou leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisibles. Ce concept fait également référence à toute modification de l'énervement, dans le respect des règles écologiques de stabilité et d'équilibre, qui conduisent au maintien des organismes miscible en dessous d'un seuil économique. [101].

b) Lutte chimique

Lutte chimique apparait encore aujourd'hui comme le moyenne plus efficace par l'agriculture, et plus rentable pour les industries phytosanitaires dans le contrôle des organismes nuisibles.

D'une manière générale ; les produits chimiques de lutte contre les insectes peuvent se classer en deux grands groupes. On désigne d'une part ceux à action immédiate, d'autre part ceux qui persistent sur la denrée et agissent au cours d'une période plus ou moins prolongée. La première classe regroupe les fumigants et la seconde les insecticides de contact.

c) Lutte physique

c.1) La chaleur

En règle générale, les températures à 40°C entraînent à brève échéance la mort de la plupart des ravageurs des denrées stockées, théoriquement, c'est le moyen le plus sûr et le plus hygiénique pour lutter contre les insectes des denrées, à condition de respecter quelques principes simples : le choc thermique doit se faire le plus rapidement possible avec une température égale à 60°C pendant 10 minutes et être suivi impérativement d'un refroidissement jusqu'à la température normale de conservation. [101]

Cette technique est inapplicable au niveau des semences du fait qu'il met en danger leur capacité germinative.

d) Le froid

Les basses températures ont pour effet de ralentir dans un premier temps l'activité alimentaire et de réduire les mouvements d'insectes. Ce phénomène est suivi d'une paralysie totale au niveau du développement, laquelle aboutit à la mort par refroidissement.

[89], notent qu'entre 12°C et 15°C, la plupart des insectes adultes des denrées entreposées ne pondent plus.

Cette technique est aussi coûteuse en énergie électrique. Elle exige des cellules bien isolées et un puissant circuit de ventilation associé générateur d'air frais.

III.6. La relation entre l'insecte et l'huile essentielle.

Les insecticides de synthèse sont actuellement les moyens utilisés pour protéger les grains stockés. Cependant, cette lutte chimique a été associée à des dangers, comme la pollution de l'environnement, la toxicité humaine, le développement de la résistance aux insecticides [102],[103],[104].

Dans l'optique de réduire les pertes post-récoltes, de préserver l'environnement et d'épargner le consommateur des produits toxiques, plusieurs travaux sont orientés à présent vers la mise au point d'insecticide à base de plantes. Il s'agit précisément des huiles essentielles extraites de ces plantes qui peuvent être appliquées sur les ravageurs de blé (*Tribolium castaneum*). [105], [106], [107], [108], [109].

Il se dégage de ces travaux que les huiles essentielles sont efficaces sur de nombreux insectes ravageurs des stocks [110]

Chapitre IV

Matériels et méthodes

Notre travail a été effectué au sein du laboratoire de génie des procédés et laboratoire d'analyse à la faculté des sciences et technologie de Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana.

L'objectif est l'extraction et caractérisation des huiles essentielles de deux plantes aromatique « l'Eucalyptus et laurier » et le développement de nouveaux bio insecticides ainsi que l'évaluation des activités biologiques notamment l'activité antibactérienne et antioxydant

Dans cette partie expérimentale nous avons présenté les deux axes de recherche ;

Le premier axe, est consacré à réaliser les étapes suivantes :

-) L'extraction des huiles essentielles des espèces végétales.
-) L'analyse organoleptique et physico-chimique des huiles essentielles extraites.
-) Caractérisation des huiles essentielles par méthode chromatographique en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC/MS).

Dans le deuxième axe :

-) L'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles.
-) L'étude du pouvoir antioxydant des huiles essentielles par la méthode de DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil*).
-) L'étude de du pouvoir bio insecticide des huiles essentielles de deux plantes aromatiques «*l'Eucalyptus (globulus) et laurier (laurus Nobilis L* » sur le ravageur des céréales stockées *T.castaneum*, par la détermination de la DL₅₀-DL₉₀, TL₅₀-TL₉₀, à l'aide du traitement par d'inhalation.

IV.1. Préparation du matériel végétal

L'échantillonnage a été fait à la période de floraison, dans une région propre, loin de tout impact de pollution. Les dates, (**Tableau IV.1**)

Après la récolte, les plantes ont été identifiées au laboratoire de recherche de génie des procédés de l'université Khemis Miliana à l'aide de la flore d'Algérie de Quezel et Santa (1962) [78].

Tableau IV.1 : Origines et dates de récolte des plantes.

| Plantes | Origine | Date de récolte |
|------------|-----------------|-------------------------|
| Eucalyptus | La zone d'Attaf | 07/01/2018 à 15/04/2018 |
| Laurier | La zone d'Attaf | 07/01/2018 à 15/04/2018 |



Figure IV.1 : Photographie de plantes étudiées.

IV.2 .Localisation de la zone étudiée

Les matières végétales utilisées pour l'extraction des huiles essentielles sont des feuilles. Celle des Eucalyptus globulus et des laurier (laurus nobilis) ont été prélevées dans la wilaya Ain Defla (municipalité de Attaf) au Nord d'Algérie (Figure IV.2).



Figure IV.2 : Localisation de la zone étudiée.

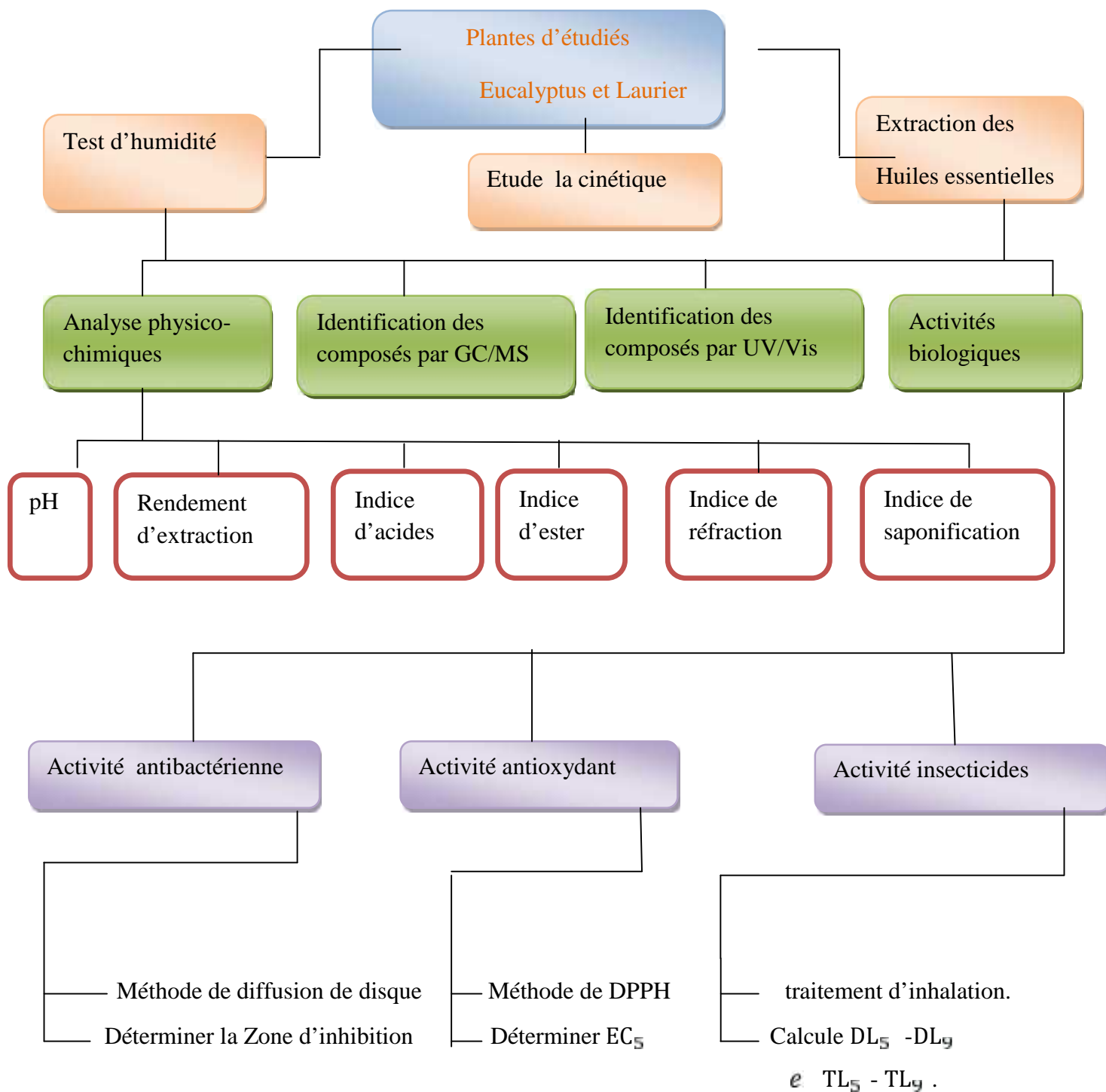


Figure IV.3. Diagramme général de la procédure expérimentale.

IV.3. Extraction des huiles essentielles

La mise en œuvre de l'extraction des produits naturels en général, et des huiles essentielles en particulier, est confrontée à un certain nombre de problèmes, qui sont le plus souvent :

-) La faible teneur de l'huile essentielle dans la matière végétale.
-) Les contraintes de récoltes saisonnières du matériel végétal qui posent le souci de son stockage.

Afin d'étudier les paramètres physico-chimiques, les compositions chimiques et les activités biologiques de nos huiles essentielles, nous avons choisi l'hydrodistillation comme méthode d'extraction des huiles essentielles. C'est le procédé le plus simple et souvent utilisé.

L'extraction des huiles essentielles est effectuée par un appareil de type Clevenger. Il est composé d'une chauffe ballon, un ballon de capacité de 1L où les échantillons sont immergés avec l'eau pendant 3 heures, d'une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et une ampoule à décanter qui reçoit les extraits de la distillation.

Les échantillons des huiles essentielles sont conservés à l'abri de l'air et de la lumière dans des flacons opaque à une température de 4°C

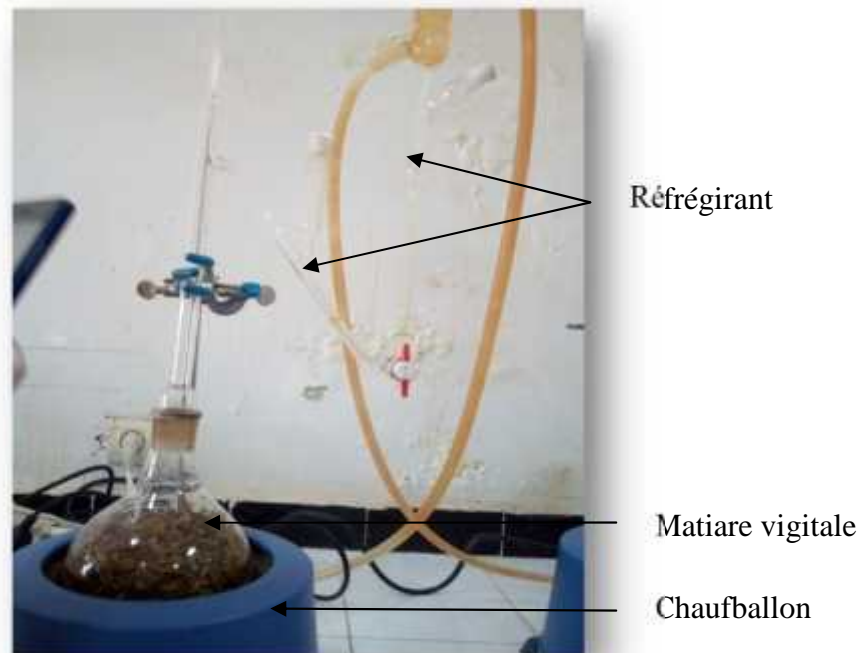


Figure IV.4 : Montage d'extraction par hydrodistillation type (Clevenger)

IV.3.1 Détermination du taux d'humidité du matériel végétal

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans le végétal frais. Les feuilles récoltées d'Eucalyptus globules et de laurier ont été étalées en couche minces sur le sol pour le séchage à la température ambiante et à l'abri du soleil pendant 7 jours [111].

$$H\% = [(m_0 - m_1)/m_0] \times 100 \quad \text{IV.1}$$

Avec :

H(%) : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

m₀ : Masse de l'échantillon prise en g.

m₁ : Masse de l'échantillon après séchage en g.

IV.3.2 Détermination des rendements en huiles essentielles

L'extraction par hydro distillation des huiles essentielles de plantes étudiées a été menée chaque jour, pour définir la valeur maximale du rendement en fonction du temps de séchage et dans les mêmes conditions de travail. Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal utilisé pour cent. Après récupération des huiles essentielles, le rendement est calculé par la formule suivante [112].

$$R_H \% = \frac{m}{m_0} \times 100 \quad \text{IV.2}$$

Avec :

R_{HE}: Rendement en huiles essentielles (en %) pour 50 g de la matière sèche

m : Masse d'huiles essentielles récupérées (g)

m₀: Prise d'essai du matériel végétal (g).

IV.3.3 Etude de la cinétique d'extraction

La cinétique est le suivi de l'évolution de la quantité d'huile essentielle extraite par hydrodistillation d'une masse de végétale en fonction du temps. Nous avons procédé à l'étude de la cinétique de rendement d'extraction des espèces végétales considérées.

Le système de « Clevenger » nous a permis d'effectuer des prélèvements horaires sur les phases organiques toute en gardant la même charge végétale. Le premier prélèvement a été effectué après 15 mn de la mise en marche du procédé d'hydrodistillation, l'autre prélèvement qui s'étalent de 0 à 180 min

Les fractions d'HE obtenues après séparation et séchage ont été pesées puis conservées dans des flacons hermétiques opaque à une température < 6 C°.

IV.3.4 Caractéristiques des huiles essentielles

La caractérisation d'une huile essentielle consiste à :

-) Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur, saveur)
-) Déterminer ses indices physiques (rendement, densité, indice de réfraction... etc.
-) Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

IV.3.4.1. Caractéristiques organoleptiques

Chaque huile essentielle est caractérisée par ces caractères organoleptiques tels que

a) L'odeur

L'odorant est un sens chimique très sensible et l'habilité des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimique parvient à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'à dix millièmes de grammes par litre d'air [113].

b) La couleur

La couleur de nos huiles est peut être déterminé à l'œil nu, sauf en présence d'une solution étalon, on peut l'utiliser pour évaluer le degré de ressemblance entre la couleur du produit étalon et celle de l'huile.

c) L'aspect physique

De même, l'aspect d'une essence végétale change selon les produits qui la constituent, qui peut nous apparaître sous forme solide, liquide ou solide-liquide.

d) Saveur

C'est le goût de l'huile.

IV.3.4.2 Analyses physico-chimiques d'huiles essentielles

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico- chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) [113].

a) Analyses physiques

a.1) Détermination de pH

PH l'abréviation de potentiel d'hydrogène mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H^+) (appelés aussi couramment protons) en solution. Plus couramment il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre. La détermination de pH est effectuée par un papier pH, il suffit de déposer quelques gouttes de l'HE sur un côté de la bandelette et de comparer la couleur qui apparaît avec l'échelle de couleur qui se trouve au verso.



Figure IV.5: Papier indicateur de pH.

a.2) Indice de Réfraction

L'indice de réfraction d'un milieu homogène, transparent, isotrope peut être défini comme le pouvoir que possède ce milieu de dévier un rayon lumineux arrivant sur sa surface [114].

L'indice de réfraction varie avec la température et la longueur d'onde de la lumière utilisée. C'est la raison pour laquelle, par souci de cohérence, on travaille à 20°C avec la raie D de la vapeur de sodium (589.3 nm). Si les mesures sont réalisées à une température différente, par exemple 25°C, ceci doit être spécifié.

L'indice de réfraction à la température de référence t est donné par la formule :

$$[n]_D^t = n_D^t + 0, (t - t) \quad \text{IV.3}$$

Où :

$[n]_D^t$: Est l'indice de réfraction de référence.

$n_D^{t'}$: Est l'indice de réfraction mesurée.

t : Température de référence qui est à 20.

t' : Température au moment de la mesure

0,00045 : Variation d'indice de réfraction quand la température varie de 1°C.[115].

Le mode opératoire consiste les étapes suivantes :

-) L'instrument est réglé à une température ambiante (20°C).
-) Verser une goutte d'H.E sur la surface du prisme.
-) Fermer le couvercle du prisme, assurer que le film d'H.E ne contient pas de bulles d'air, puis pointer le réfractomètre en direction d'une source lumineuse.
-) Quand il y a du liquide sur le prisme, le champ est divisé en une partie claire et une partie sombre. Le point auquel la ligne de démarcation entre ces deux parties traverse l'échelle verticale donne la mesure. On peut ajuster la ligne sur l'échelle verticale à l'aide de vis située au-dessus ou au-dessous de la boîte contenant le prisme.
-) Lire avec précision la valeur affichée.



Figure IV.6 : Réfractomètre.

b) Analyses Chimiques

b.1) Détermination de l'indice d'acide

L'indice d'acide I_A est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1g de substance [116] ; [117].

L'hydroxyde de potassium réagit avec l'acide selon la réaction suivant :



Le principe consiste à neutraliser des acides libres par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée.

Le mode opératoire consiste d'introduire 1g d'huile essentielle dans une fiole où on ajoute 5 ml d'éthanol. Puis, on fait l'agitation et le titrage avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée ($C(\text{KOH}) = 0.1 \text{ mol/l}$), en présence de phénolphtaléine (indicateur coloré). La couleur jaune clair du liquide (la couleur de l'huile essentielle) vire à la neutralisation vers une couleur rose. Le volume de KOH qui a servi à la neutralisation est lu directement sur la burette.

L'indice d'acide est exprimé par la formule :

$$I_A = (56.11 \times N \times V)m \quad \text{IV.4}$$

Avec :

I_A : Indice d'acide.

N : normalité de KOH.

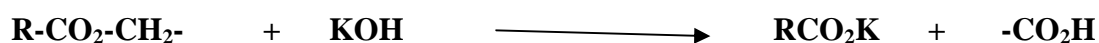
V : Volume en ml de la solution éthanolique de KOH utilisée pour le titrage.

m : Masse en grammes de l'huile essentielle.

b.2) Détermination de l'indice d'Ester (I_E)

L'indice d'ester, est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile. [118].

Hydrolyse des esters par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium, et dosage de l'excès par une solution titrée d'acide chlorhydrique.



Le mode opératoire consiste d'introduire dans un ballon de 100 ml, 1 g d'HE et 25 ml d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium(KOH) 0.5 M.L'ensemble est porté au reflux pendant 1 h .Après refroidissement de la solution on ajoute 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes de phénolphtaléine.

L'excès de KOH est titré avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0.5 Jusqu'à la disparition de la couleur rose.

Une opération à blanc est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment.

L'indice d'ester (I_E) est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$I_E = \left(\frac{Z \cdot 10}{m} \right) (V_0 - V_1) - I_A \quad \text{IV.5}$$

Avec :

V_0 : Volume en ml de la solution d'HCl (0.1 N) mesure pour l'essai à blanc.

V : Volume en ml de la solution d'HCl (0.1N) mesuré pour le calcul de I_E .

m : Masse en g de la prise d'essai.

I_A : Valeur d'indice d'acide.

b.3) Détermination de l'indice de saponification

L'indice de saponification (I_S) est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance. [116], [114].

L'indice de saponification est donné par la formule suivant :

$$I_S = I_A + I_E \quad \text{IV.6}$$

I_S : L'indice de saponification.

I_A : L'indice d'acide.

I_E : L'indice d'ester.

IV.3.5.Tests analyses

IV.3.5. 1 Analyse de la composition chimique de l'HE par (UV/Vis)

Le spectre UV dans l'heptane absolu a été enregistré sur un appareil Beckman modèle 25.Le mode opératoire consiste de dissolvez 0.5g pour chaque huile « l'Eucalyptus et laurier » dans 3ml de heptane. Une analyse dans le spectrophotomètre d'absorbance UV de la solution préparée. [114].

IV.3.5.2. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles par CG/MS

L'analyse des huiles essentielles a été effectuée à (laboratoire d'analyse de l'université Djilali Bounaama de Khemis Miliana), Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est un Agilent 6890, suivi d'un spectromètre de masse type Agilent 5975B à quadripôle de tension d'ionisation de 70 eV. La colonne utilisée est une HP-5MS; 5% PhenylMethyl Siloxane d'une longueur de 30 m et d'un diamètre interne égale à 0,25mm. L'épaisseur du film étant de 0,25 µm.

Les conditions opératoires sont :

-) La température de l'injecteur (mode split 1:50) : 250°C
-) La programmation de température : de 50 °C à 300 °C à raison de 2°C/min ;
-) Le gaz vecteur utilisé est l'Hélium avec un débit de 0.8 ml/min.

Les températures de la source du quadripôle sont fixées, respectivement, à 230 °C et à 150 °C.



Figure 1V.7 : Appareil de chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la spectrophotométrie de masse.

IV.3.6 Activités biologiques

IV.3.6.1 Détermination de l'activité antibactérienne d'HE (*Eucalyptus globulus*), Laurier (*Laurus Nobilis L*)

Les huiles essentielles ont un spectre d'action antibactérienne très large puisqu'inhibe bien la croissance des bactéries. L'activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Ce qui nous a amené à évaluer l'activité des huiles essentielles du *Eucalyptus (globulus)*,

Laurier (laurus nobilis L). Les tests biologiques sont effectués sur quatre souches bactériennes pathogènes :

Escherichia coli, *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus subtilis* et *Serratia marcescens* par la méthode de diffusion sur milieu solide (*gélose*).

a) Etude microbiologique

Pour la détermination la zone d'inhibitions, il faut travailler avec des souches de référence. Cela nous a obligé à utiliser seulement souches disponibles au niveau du laboratoire **Zibouche** de microbiologie d'Ain Defla.

Tableau IV.2 : Liste des microorganismes testés.

| Souches | N° selon l'ATCC |
|--------------------------------|-----------------|
| <i>Escherichia coli</i> . | 10536 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> . | 29737 |
| <i>Bacillus subtilis</i> . | 15245 |
| <i>Serratia marcescens</i> . | 27117 |

b) Préparation des disques

On utilisé le papier whtaman coupé en contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques une fois préparés, sont introduit dans un flacon en verre et places dans l'autoclave pendant 20 minutes à 120C°.

c) Milieu de culture

La gélose Mueller Hinton est préparée en dissolvant 19g de poudre de gélose dans 500 ml d'eau distillée dans une arlène placées sur une agitateur-plaque-chauffante. La gélose dissolue est versée dans des flacons puis stérilisé dans l'autoclave à 120 C° pendant 20 minutes, et enfin conservée dans le réfrigérateur à 4C°.

Avant utilisation la gélose Mueller Hinton. Est fondu dans un bain marie à 95C°et coulé en boite de pétrie sur une épaisseur de 2mm, les géloses sont pré- séchées avant l'emploi.

d) Préparation des dilutions

On prépare quatre dilutions d'huile essentielle de concentrations déférentes : [1/2,1/4,1/6 et 1/8] (v/v) dans diméthylesulfoxyde (DMSO).

Tableau IV.3 : Préparation des dilutions.

| concentration | HE pur (μl) | DMSO (μl) |
|---------------|--------------------------|------------------------|
| 1/2 | 500 | 500 |
| 1/4 | 250 | 500 |
| 1/6 | 125 | 500 |
| 1/8 | 62.5 | 500 |

e) Préparation de l'inoculum

A partir des boîtes contenant les germes pathogènes (*Escherichia coli* (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Saritinia*) on a préparé des suspensions microbiennes pour chaque espèce. A l'aide d'une pipette pasteur on prélève deux ou trois colonies pures et bien isolées qu'on décharge dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérilisées. L'enrichissement dure pendant 24 heures.

f) L'ensemencement

Cette opération doit se faire dans les 24 heures qui suivent la préparation de l'inoculum. On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne. Puis on fait flotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélose sèche, de haute en bas, en stries serrées. L'opération doit se faire deux fois en tournant la boîte de pétrie d'un angle de 60 à chaque fois.

**Figure IV.8** : Ensemencement bactérie.

g) L'application des disques

Pour les dilutions des huiles chaque boîte de pétri contenant 6 disques, 4 disques pour les dilutions préparés, 1 pour l'HE pur, 1 pour le DMSO.

A l'aide d'une micropipette on met sur chaque disque 5µl de chaque concentration différent dilution d'HE. Après l'application immédiate des disques, les sont laissées pendant 20 minute à température ambiante pour la diffusion de l'huile dans la gélose puis on incube à 37C° pendant 24 h.

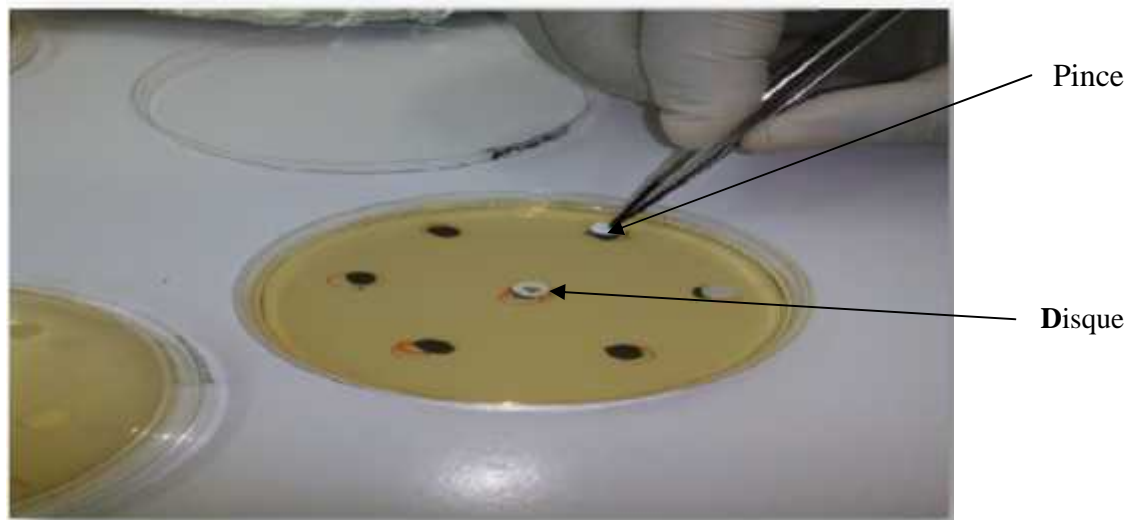


Figure: IV.9: L'application des disques.

h) Lecture

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle, à l'extérieur de la boîte fermée.

IV.3.6.2 Activité antioxydant (méthode de DPPH)

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydant de nos échantillons a été réalisée par le piégeage du radical libre DPPH.

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) en solution dans l'éthanol. Le radical stable DPPH•

Est utilisé comme radicaux oxydant pour être réduit par l'antioxydant (AH) selon le mécanisme suivant :



Le radicale DPPH absorbe à 517 nm. Il fixe un hydrogène arraché à l'antioxydant AH pour former le DPPH-H qui n'absorbe pas à 517 nm. Cette transformation est accompagnée par une décoloration de la solution. Cette méthode représente un moyen pratique pour mesurer l'activité antioxydant des huiles essentielles.

L'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle de CG a été évaluée en mesurant sa capacité de piéger le radicale libre (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) qui en présence d'antioxydant, se réduit en DPPH-H (2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle).

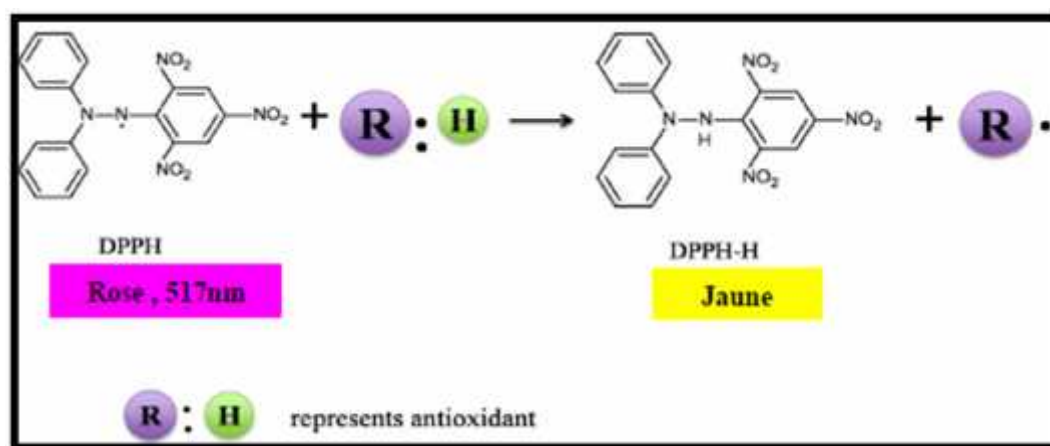


Figure IV.10: Forme libre et réduite du DPPH [119].

a) Mode opératoire

Le test de DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par Bucar et Burit[120] ou 50 μ L de chacune des solutions éthanoliques des HE testées à différentes concentrations sont mélangées avec 2 ml d'une solution éthanolique de DPPH à 0,004% . Après une période d'incubation de 30 minutes à la température de laboratoire, l'absorbance est lue à 517nm. L'inhibition du radical libre DPPH* par la vitamine C a été également analysée à la même concentration, ainsi que les paramètres de calcul de l'activité antioxydant pour la vitamine C et l'H.E.

b) Détermination du pourcentage d'inhibition

D'après Khodashenas[121].L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée selon la formule suivante :

$$I(\%) = 100 \times \frac{A_c - A_{c'}}{A_c} \quad \text{IV.7}$$

A_{control} : Absorbance du blanc (DPPH dans le éthanol).

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de la prise d'essai.

Le pourcentage du DPPH inhibé en fonction des concentrations en HE et en vitamine C (Acide Ascorbique) a été tracé à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC_{50} . Ce paramètre est défini comme étant la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH* initiale de 50% [122].

La concentration effectrice (EC_{50}) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50 d'effet piègeur du radical DPPH (concentration équivalente à 50 de DPPH perdu). Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance anti radicalaire [123].

$$A = \frac{1}{E} \quad \text{IV.8}$$

ARP : Puissance anti radicalaire.

EC_{50} : La concentration effectrice d'échantillon pour réduire 50 de DPPH.

c) Pour l'acide ascorbique (protocole positif)

On a utilisé l'acide ascorbique pour le test positif de l'effet antioxydant, on a suivi le même protocole que celui des HE, sauf qu'on a changé HE par l'acide ascorbique (vitamine C) et à la fin on a trouvé la valeur de I_{c50} de l'acide ascorbique.

IV.3.6.3. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles des Eucalyptus et de Laurier par inhalation

a) Préparations des doses traitement

Pour les deux plantes *Eucalyptus (globulus)* et *Laurier (laurus Nobilis L)*, la préparation des doses on été faite sur la base de quelques essais préliminaire.

Les premières doses préliminaires testées sont 50µl, 60 µl, et 80µl. Il s'est que les premières doses choisies sont très élevées. C'est ce qui nous a amené à modifier et prendre les doses suivantes 10µl, 20µl, 30µl, 40µl, pour les feuilles de *Eucalyptus (globulus)* et *Laurier(laurus NobilisL)*.

Les volumes des huiles ont été mesurés à l'aide d'une micropipette d'une gamme de (10µl - 50µl) et de (10µl – 100 µl).



Figure IV.11 : Matérielle utilisé pour notre expérience.

b) Protocole expérimentale

Chaque huile essentielle est testée par la suite en utilisant de nouvelles doses choisies après les tests préliminaires (10ul, 20ul, 30ul, 40ul) pour les adultes de **T. Castaneum**.

Le teste d'insecticide a été réalisé sur dix individus adultes enfermés une boîte de pétrie bien fermés à l'aide de para film afin d'éviter que les huiles essentielles s'échappent (figure II.12).

Les doses des huiles essentielles déposées à l'aide d'une micropipette dans un papier filtré, sont mises dans un bouchon de 3 cm de diamètre imprégné en papier aluminium et couvert par un morceau de toile (chèche). La toile est maintenue par un élastique évitant tout contact direct de l'insecte avec l'huile essentielle.

Ainsi les bouchons préparés sont mis dans des boîtes de pétrie (volume intérieur 0.098 litre et de 3 cm de diamètre et 1 cm de profondeur) jouant le rôle de chambre d'inhalation, en présence des insectes au nombre de dix (10) individus par boîte. Pour chaque dose testée, ont réalisé deux répétitions. Les boîtes bien fermées, sont rangées dans une armoire où la température et l'humidité sont contrôlées. Soit 20 à 28 C° pour la température et 65 à 70 pour l'humidité.

Les témoins, ont été traités qu'avec de l'eau distillée stérile. La compagne des insectes morts a été réalisé 24h, 48h, 72h, 96h, 120h après le traitement. Les individus notés morts sont enregistrés un répertoire pour chaque répétition et chaque dose.

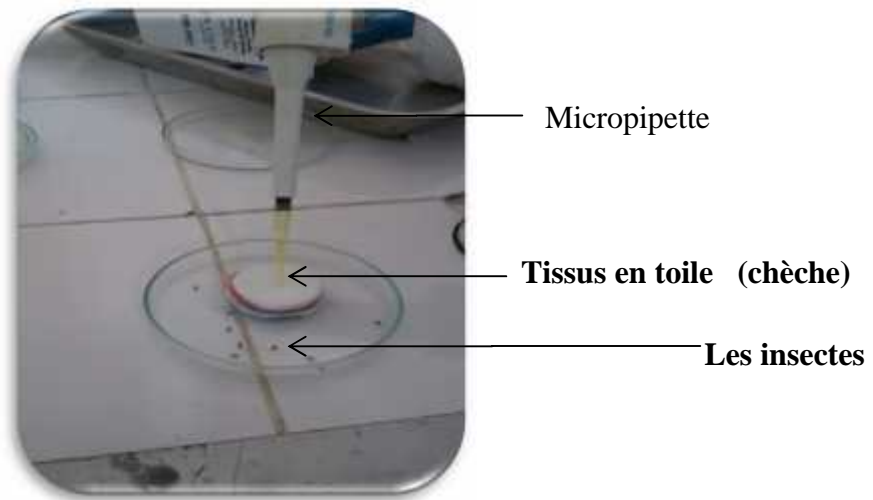


Figure IV.12: Evaluation de la toxicité par le teste d'inhalation.

Le dispositif expérimentale est constitué par 2 blocs constitués par un témoin et une répétition pour chacun des plantes, chaque boîte de pétrie comporte des individus homogènes de **Tribolium Castanaum** au nombre de 10 ce dispositif est installé dans les mêmes conditions que celui de l'avalage en masse (figure II.13).

Une fois le traitement réalisé, les mortalités sont observées et notées dès le premier jour et sont poursuivies jusqu'au cinquième jour pour constater l'évolution



Figure IV. 13:Traitement par inhalation de Tribolium Castaneum.

c) Expression de résultats

Pour chaque huile essentielle le pourcentage moyen de mortalité est calculé ensuite corrigé par la formule d'Abbott (1925) :

$$MC\% = \frac{(M - M_T \times 100)}{(100 - M_T)} \quad \text{IV.9}$$

M_C : Mortalité corrigée.

M : Pourcentage de morts dans la population traitée.

M_T : Pourcentage de morts dans le témoin.

IV.3.6.3.1. Calcul des doses létales et temps létaux (DL₅₀ ; DL₉₀ ; TL₅₀ et TL₉₀)

Pour calculer la DL₅₀ ; DL₉₀ et TL₅₀, TL₉₀ nous avons transformé les doses et les valeurs de pourcentages de mortalité en probité en se servant de la table de **(Bliss in Cavalier, 1976)**

Ces transformations vont nous permettre à l'aide d'un logiciel EXCEL d'obtenir des équations de droites de régression de type : $y = a x + b$

Y : Probité de mortalité corrigée.

X : Logarithme de la dose ou du temps

a : La pente.

b : Valeur constante.

Tableau IV.4. Transformation des pourcentages en probités.

| % | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 0 | / | 2,67 | 2,95 | 3,12 | 3,25 | 3,36 | 3,45 | 3,52 | 3,59 | 3,66 |
| 10 | 3,72 | 3,77 | 3,82 | 3,87 | 3,92 | 3,96 | 4,01 | 4,05 | 4,08 | 4,12 |
| 20 | 4,16 | 4,19 | 4,23 | 4,26 | 4,29 | 4,33 | 4,36 | 4,39 | 4,42 | 4,45 |
| 30 | 4,48 | 4,50 | 4,53 | 4,56 | 4,59 | 4,61 | 4,64 | 4,67 | 4,69 | 4,72 |
| 40 | 4,75 | 4,77 | 4,80 | 4,82 | 4,85 | 4,87 | 4,90 | 4,92 | 4,95 | 4,97 |
| 50 | 5,00 | 5,03 | 5,05 | 5,08 | 5,10 | 5,13 | 5,15 | 5,18 | 5,20 | 5,23 |
| 60 | 5,25 | 5,28 | 5,31 | 5,33 | 5,36 | 5,39 | 5,41 | 5,44 | 5,47 | 5,50 |
| 70 | 5,52 | 5,55 | 5,58 | 5,61 | 5,64 | 5,67 | 5,71 | 5,74 | 5,77 | 5,81 |
| 80 | 5,84 | 5,88 | 5,92 | 5,95 | 5,99 | 6,04 | 6,08 | 6,13 | 6,18 | 6,23 |
| 90 | 6,28 | 6,34 | 6,41 | 6,48 | 6,55 | 6,64 | 6,75 | 6,88 | 7,05 | 7,33 |
| 99 | 7,33 | 7,37 | 7,41 | 7,46 | 7,51 | 7,58 | 7,75 | 7,75 | 7,88 | 8,09 |

Chapitre V

Résultats et discussions

V. Résultats et discussion

V.1. Rendement d'extraction d'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L.

Les huiles essentielles ont été extraites des matériaux végétaux secs, le rendement en huile essentielle est variable en fonction de la plante utilisée, le matériel employé pour l'extraction et la méthode d'extraction, aussi bien l'origine de la plante. Pour chaque plante, le rendement maximal obtenu est résumé dans le (**Tableau V .1**) et le (**figure V .1**)

Tableau V.1 : Rendement en (%) des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis*

| La plante | m_0 (g) | m(g) | Rendement (%) |
|----------------------------|-----------|------|---------------|
| Eucalyptus globulus | 0.65 | 100 | 0.65 |
| | 0.56 | 100 | 0.56 |
| | 0.54 | 100 | 0.54 |
| | 0.27 | 100 | 0.27 |
| Laurier | 0.58 | 100 | 0.58 |
| | 0.56 | 100 | 0.56 |
| | 0.53 | 100 | 0.53 |
| | 0.47 | 100 | 0.47 |

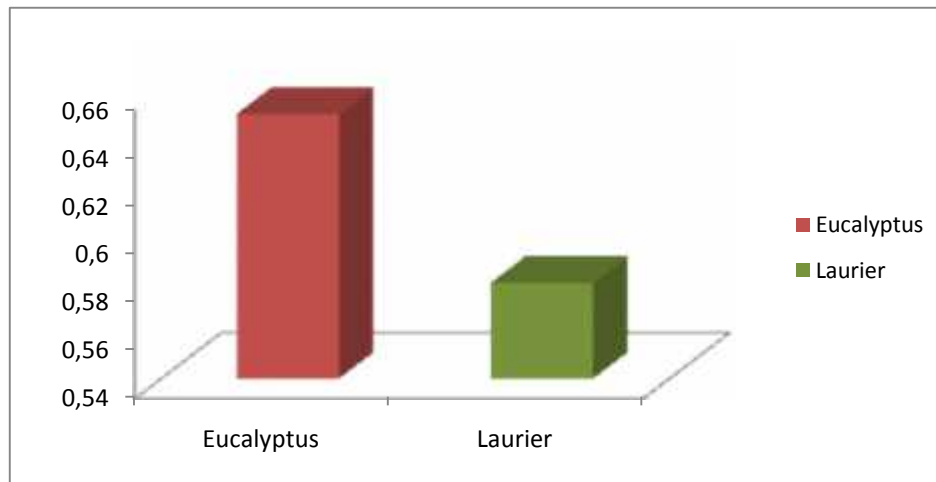


Figure V.1 : Rendement en huile essentielle obtenue.

Les rendements en huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L. issues de l'hydrodistillation, ont été estimés respectivement à 0.65% et 0,58 %.

Cela peut être dû aux différents facteurs qui rentrent en jeu .Parmi eux on cite la nature du sol, la période de la récolte, la durée de séchage, le mode d'extraction.

V.2. Humidité de la matière végétale

La détermination de l'humidité des espèces est regroupée dans la (figure V.2) Les résultats ont montré une diversité sur le taux d'humidité d'une plante à une autre où révélé un taux 79% et 21% pour *Laurier* et eucalyptus respectivement. Ce qui signifie que 55% et 45 % représentent le taux de matière sèche et la matière d'eau ayant servi réellement à l'extraction des huiles essentielles pour chaque plante respectivement.

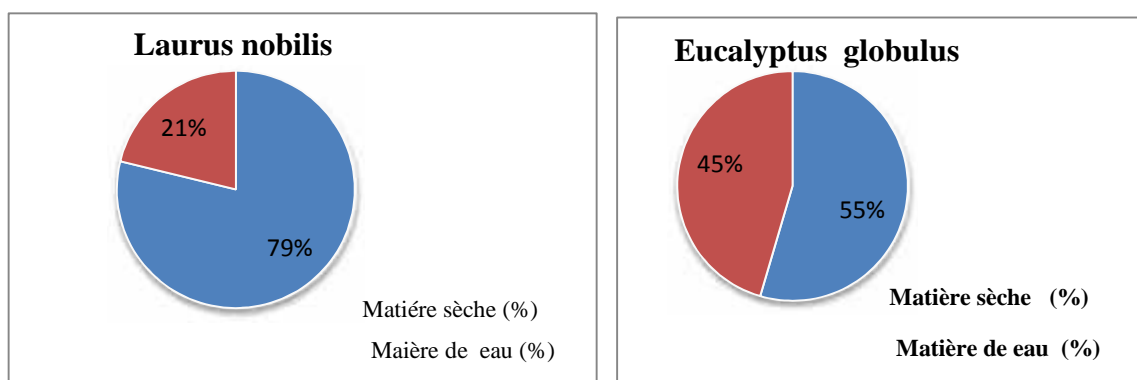


Figure V.2: Taux d'humidité des plantes

V.3 Etude de la cinétique d'extraction d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L.

Les résultats du suivi de la cinétique d'extraction des huiles essentielles, par la méthode d'hydrodistillation conventionnelle, des deux essences végétales considérées, nous ont permis de tracer les courbes des cinétiques ; celles –ci traduisant les rendements en huile essentielles des deux espèces végétales en fonction du temps :

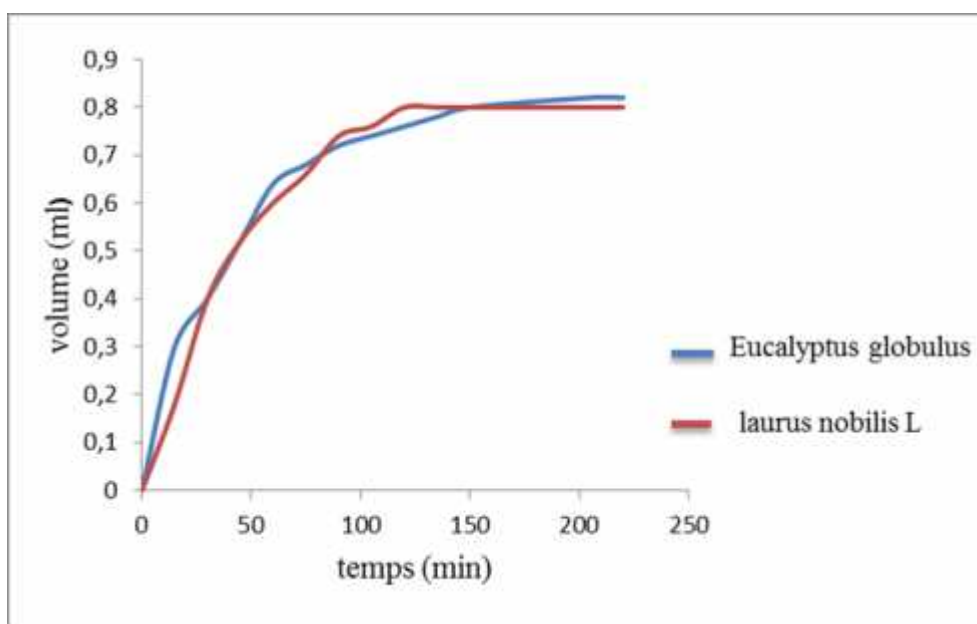


Figure V.3: Cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L.



Les courbes de cinétique en huiles essentielles obtenues présentent une croissance progressive, durant la première partie, pendant laquelle se réalise le chauffage de la matière végétale, nous avons observé une augmentation de la température dans l'hydrodistillateur, étape durant laquelle aucune extraction d'huile essentielle ne se produit. Cette température est initialement voisine de la température ambiante puis elle augmente au fur et à mesure pour atteindre 100° C, correspondant à la température d'ébullition de l'eau. La première étape correspond à l'extraction des premières quantités d'huile essentielle, nous observons une augmentation régulière du volume entre 15 et 60 min, ce qui correspond à 0.6 ml à 0.74 ml de la totalité d'huile stockée ainsi les rendements obtenus sont 0.47 % et 0.52 %, respectivement pour d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L.

De 60 à 120 min, nous enregistrons un ralentissement de l'extraction du volume reste stationnaire avec un peu moins 0,8ml. De ce fait, la courbe s'infléchit et marque un palier. Enfin, au cours de la troisième étape, la courbe tend vers un second palier, qui correspond, pour une matière donnée, au rendement maximum pouvant être atteint, dans les conditions expérimentales considérées.

V.4. Caractères Organoleptiques d'HE d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L.

Les huiles essentielles des plantes étudiées sont très aromatiques. Elles sont liquides et d'une couleur jaune clair à jaune foncé. Les caractères organoleptiques de ces deux espèces végétales sont reportés dans le tableau V.2.

Tableau V.2 : Propriétés organoleptique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L.

| Huiles | Aspect | Couleur | Odeur |
|---|--------------------------------|--------------|--------------------|
|  Eucalyptus | Liquide à température ambiante | Jaune foncé | fraiche et épicées |
|  laurier | Liquide à température ambiante | Jaune claire | Agréable |

Selon Afnor (2000), les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, elles sont plus ou moins colorées et leur densité est en général inférieure à celle de l'eau.

V.5. Propriétés physico-chimique d'HE d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L.

Les résultats des propriétés physico-chimiques d'HE de d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L. Sont regroupés dans le tableau V.3 suivant :

Tableau V.3 : Les indices physico-chimiques d'HE d'HE d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L.

| Huiles | L'indice d'acide | L'indice d'ester | L'indice de saponification | pH |
|------------|------------------|------------------|----------------------------|----|
| Eucalyptus | 3.36 | 69.57 | 72.93 | 6 |
| Laurier | 2.80 | 50.49 | 53.29 | 5 |

L'indice d'acide est un critère chimique de fraîcheur et de pureté de l'huile essentielles, il nous renseigne sur le taux d'acides gras existant dans l'huile et sur degré d'altération [124]les valeurs de l'indice d'acide pour nos huiles (laurier et eucalyptus) respectivement 2.80 à 3.36 , ceci signifie que nos huiles possèdent un taux d'oxydation très élevés ce qui provoque une dégradation rapide des huiles commerciales.

L'indice d'ester d'un lipide est la masse de potasse (KOH) (exprimée en mg) nécessaire pour saponifier les acides gras estérifiés contenus dans 1 g de matière grasse. Cet indice d'ester renseigne sur la longueur des chaînes d'acide gras. Pour un poids donné d'huiles, l'indice d'ester augmente avec la diminution de la longueur des chaînes.

Nos huiles ont des valeurs de 50.49 à 69.57 respectivement pour laurier et eucalyptus. Ces valeurs sont très élevés par rapport aux normes car nos huiles au cours du stockage subissent de nombreuses transformations sous l'action de la lumière, de l'oxygène et de température élevée. Ces changements sont en général provoqués par diverses réaction chimique dont l'oxydation

Le pH (Potentielle hydrogène) permet de déterminer le caractère acide, neutre ou basique d'une substance. Le pH se définit à travers une échelle de 1 à 14.

-) $1 < \text{PH} < 7$ PH acide.
-) $\text{PH} = 7$ PH neutre.
-) $7 < \text{PH} < 14$ PH basique (ou alcaline).

Nous huiles (laurier et eucalyptus) sont légèrement acides donc sont conformes aux normes internationales des huiles essentielles.

L'indice de réfraction de nous huiles est élève, il est supérieure à celui de l'eau à 20C° (1.3356), cela de voile leur richesse en composants qui devient la lumière polarisée. Ce dernier dépend la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaines d'acide, de leurs degrés d'instauration et de la température, il varie essentiellement avec la teneur en mono terpènes et en dérivés oxygènes, une forte teneur en mono terpènes donnera un indice élève, Pour certains auteurs, un faible indice de réfraction de l'huile indique sa faible réfraction de la lumières ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques, les indice de réfraction obtenus varient entre 1.487- 1.4725 pour laurier et eucalyptus respectivement ces résultats sont en adéquation avec les normes mentionnées par AFNOR.



Figure V.4 : Indice de réfraction de H E *Laurus nobilis* L.



Figure V.5 : Indice de réfraction de HS d' *Eucalyptus globulus*.

V.6. Spectrophotométrie d'absorption dans l'UV/ visible

D'après l'analyse dans le spectrophotomètre d'absorption UV/Vis on a obtenu les résultats dans le graphe ci-dessous.

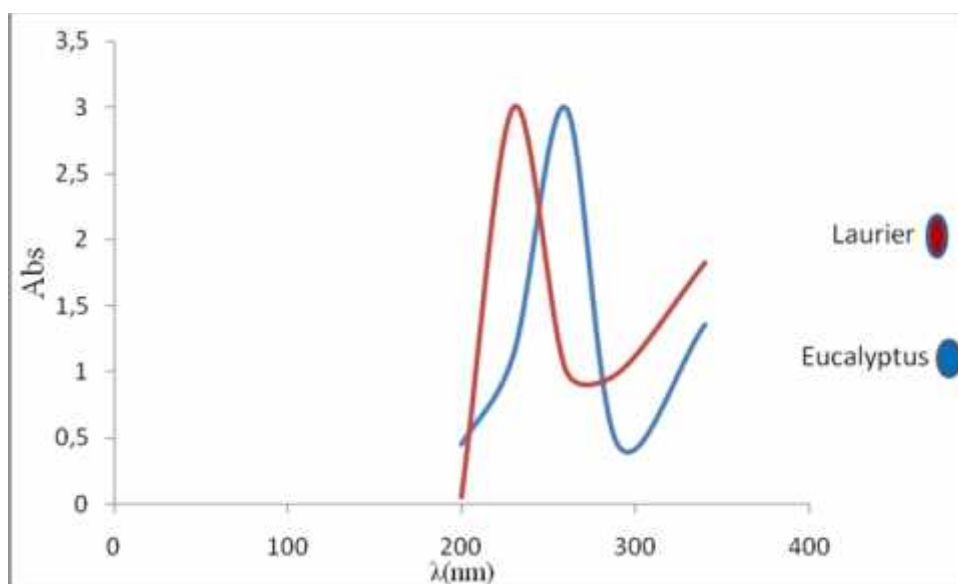


Figure V.6 : Spectre UV/vis d'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L.

Nous avons effectué l'analyse à l'aide du spectrophotomètre à UV/ visible dont l'intervalle 200 à 350 nm. On analysant le spectre UV de l'huile de eucalyptus et de laurier, on constate que la longueur d'onde maximale de eucalyptus est 230 nm à laquelle correspond l'absorbance maximale (Abs : 3) et la longueur d'onde maximale de laurier est 260 nm à laquelle correspond l'absorbance maximale (Abs : 3).

On n'a pas pu faire l'identification par UV car on n'a pas les standards de ces huiles.

V.7. Analyse des huiles essentielles par GC/MS

Les pics du chromatogramme de l'huile essentielle de chaque plante sont comparés à ceux des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre avec une banque de données informatisées, l'appareil GC/MS nous a donné les différents chromatogrammes de masse et les indices de rétention des substances comparables qui peuvent constituer cet extrait.

Les chromatogrammes de l'huile essentielle ont de nombreux pics et beaucoup d'entre eux se chevauchent. Le profil chromatographique de chaque huile essentielle des plantes est illustré dans les figures V.7 et V.9.

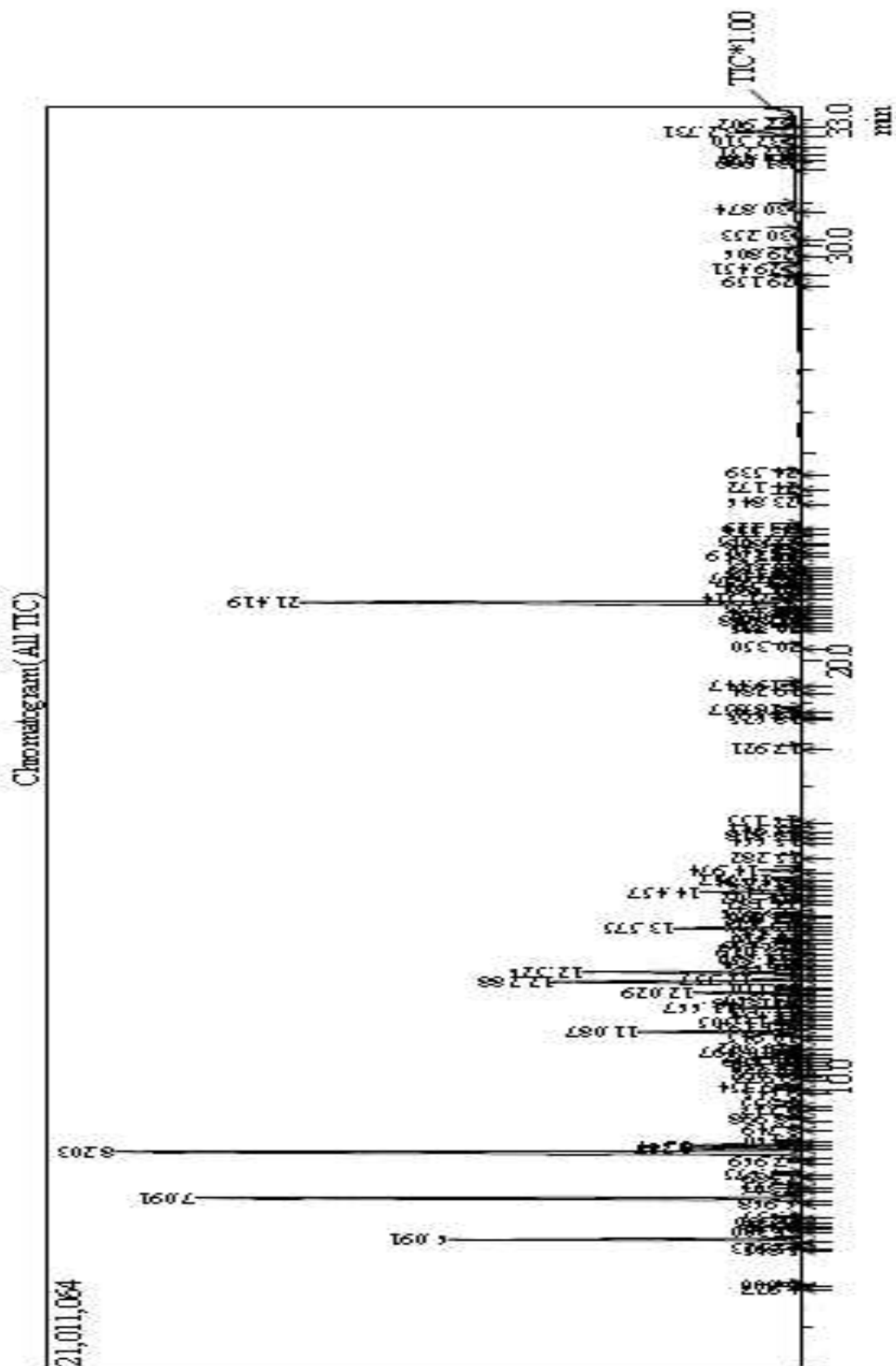


Figure V.7: Profil chromatographique de l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* L.

En plus, la GC/MS a permis de recenser vingt-deux composés à partir de l'essence de *Laurus nobilis* L. sont identifiés, ce qui correspond à un pourcentage de 99,7 % de l'ensemble des constituants isolés (Tableau V.4). Le 1,8-Cineole apparaît comme le constituant principal de l'huile essentielle (45,36%), suivi du Bornylene (17,25%), du Linalool (8,13%), et de Sabinene (7,48%) (Figure V.7).

Tableau V.4 : Composition chimique de l'Huile essentielle de *Laurus nobilis* L.

| Les composants | TR | Aera % |
|-------------------|------|--------------|
| - Thujene | 739 | 0.24 |
| 1R- - Pinene | 767 | 3.18 |
| Camphene | 820 | 0.4 |
| Sabinene | 945 | 7.48 |
| L-β- Pinene | 953 | 2.32 |
| β- Myrcene | 1022 | 0.38 |
| (+)-4-Carene | 1147 | 0.27 |
| 1,8-Cineole | 1253 | 45.36 |
| γ-Terpinene | 1373 | 0.57 |
| Terpinolene | 1535 | 0.2 |
| Linalool | 1655 | 8.13 |
| Borneol | 2008 | 0.19 |
| 4-Terpinenol | 2090 | 2 |
| -Terpineol | 2186 | 2.14 |
| L- bornyl acetate | 2766 | 0.64 |
| Pseudolimonene | 2970 | 0.6 |

| | | |
|----------------------------|------|--------------|
| Bornylene | 3216 | 17.25 |
| Methyleugenol | 3574 | 6.84 |
| Elemicine | 4444 | 0.29 |
| Nerolidol | 4466 | 0.15 |
| Spathulenol | 4511 | 0.5 |
| Caryophyllene oxide | 4529 | 0.61 |
| Total | | 99.74 |

TR : Temps de rétention.

La composition de l'huile essentielle a démontrée des tendances similaires à celles qui sont publiées pour d'autres régions géographiques : Le Monoterpène 1,8-cineole est rapporté comme étant le principal composant de l'huile essentielle du Maroc [125, 126], de [126, 127], d'Egypt [128], de Turquie [129, 130], d'Iran [131], d'Italie [132] et d'Argentine [133] gougil.

Le contenu de l'huile essentielle montre des variations dans la même plante, issue de différentes origines géographiques, et situées dans différentes parties de l'arbre. En comparant entre la composition de huile de *Laurus nobilis* L. collectées en Tunisie à celle collectées au Maroc nous constatons des différences considérables ; qui ont donné, pour la première huile des teneurs en 1,8-cineole de (56,31%), bornéol (11,04%) et valencène (11,03%)[127], et pour la deuxième des teneurs de 1,8-cineole (39,81%), 2-carène (13,03) et trans-ocimène (7,05)[126].

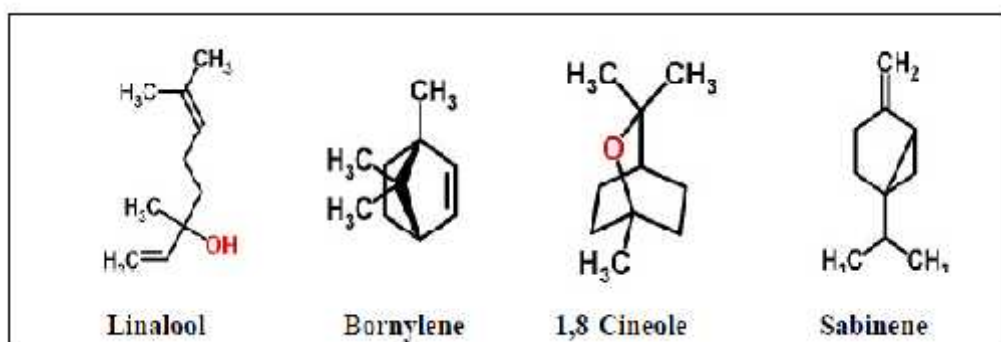


Figure V.8: Composants majoritaire de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L

Les composés obtenus, listés selon leur ordre d'éluion dans la colonne, sont résumés dans le tableau V.5.

Tableau V.5 : Composition chimique de l'Huile essentielle de *Eucalyptus globulus*.

| Composants | IR | % |
|------------------------|------|------|
| - Pinène | 930 | 9.7 |
| 1,8-cinéole | 1030 | 48.6 |
| Isoamyisovalerate | 1100 | 1.1 |
| trans -Pinocarveol | 1151 | 10.7 |
| Pinocarvone | 1165 | 1.0 |
| 4-Terpineol | 1179 | 0.3 |
| -Terpinyl acetate | 1192 | 6.6 |
| trans -Carveol | 1220 | 0.8 |
| Carvacrol | 1286 | 0.1 |
| - Terpinyl acetate | 1327 | 0.3 |
| Geranyl acétate | 1389 | 0.1 |
| Aromadendréne | 1435 | 4.6 |
| Ledene | 1480 | 0.6 |
| Viridiflorol | 1532 | 0.4 |
| Globulol | 1593 | 10.9 |
| -Eudesmol | 1646 | 0.8 |
| Juriper Camphor | 1655 | 0.6 |
| Isoaromadendrene oxide | 1695 | 0.2 |

| | | |
|-------------------------------|------|-----|
| 6,6 – Dimethyl -2-(3-oxobuyl) | | |
| bicyclo[3,1,1]heptan-3-one | 1742 | 0.2 |
| Carboxamide | 1770 | 0.7 |

IR : Indice de rétention obtenu sur une colonne DB-5MS utilisant des séries homologues de n-alcanes.

20 composés, représentant 98,3% de l'HE d'*Eucalyptus globulus* ont été identifiés. Cette huile est majoritairement composée de 1,8-cinéole (**48,6%**), -pinène (9,7%) globulol (10,9 %), *trans*-pinocarveol (10,7 %) et -terpineol (6,6%) Figure V.8.

Ces composés ont déjà été identifiés comme constituants des HE d'*Eucalyptus*. La prédominance d'oxyde terpénique 1,8- cinéole est en accord avec les résultats obtenus pour les huiles du même genre (à cinéole).

Elle présente aussi une similitude avec l'huile d'*E. camaldulensis* : 1,8- cinéole (**42,3%**), -pinène (28,3%), *p*-cymène (6.5%), -terpinène (7.3%) prélevée du Maroc en 2011 [134].

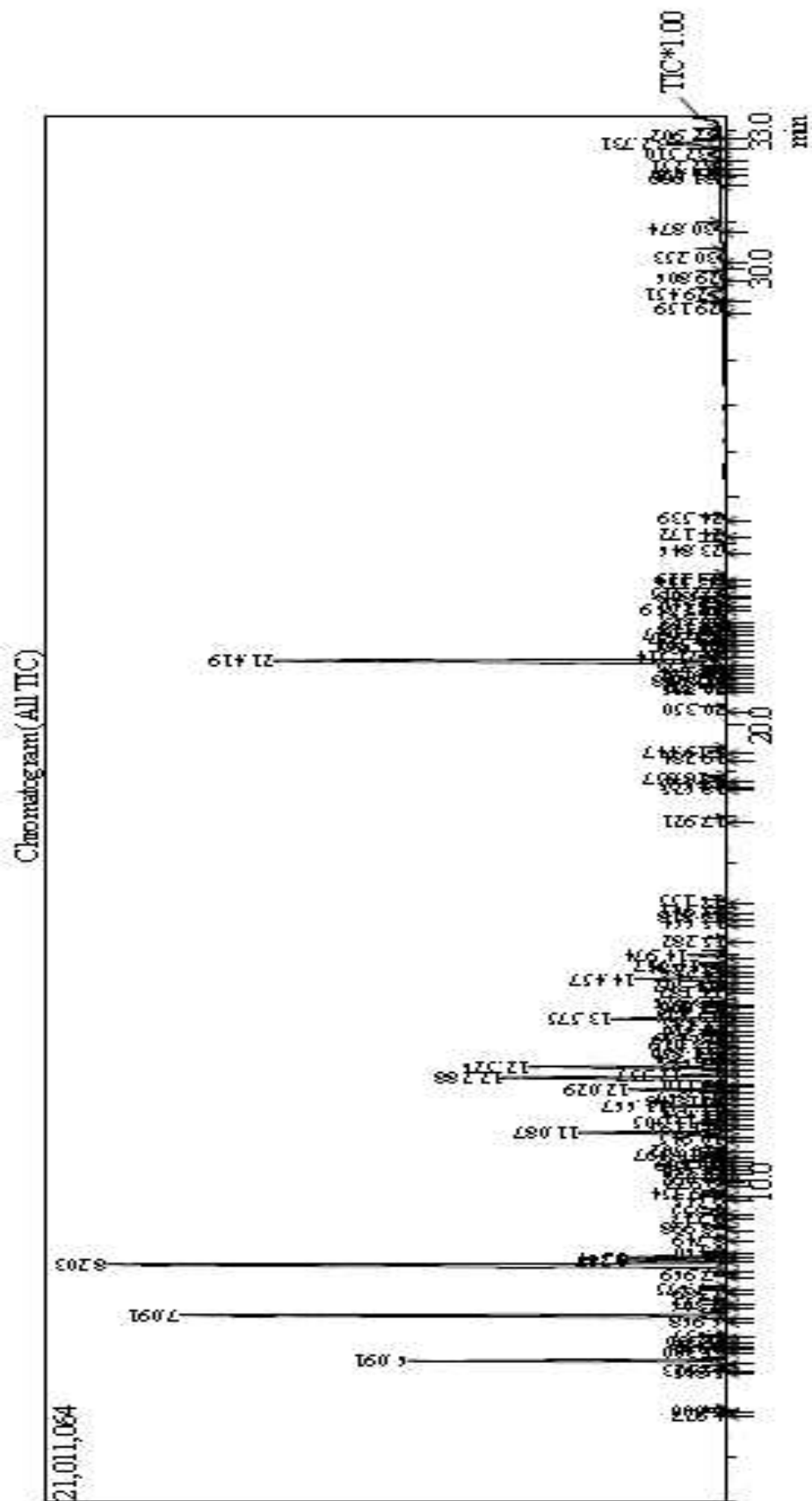


Figure V.9: Profil chromatographique de l'huile essentielle des feuilles de d'*Eucalyptus globulus*

Dans notre cas, l'huile présente un pourcentage de **(9,7%)** qui est donc supérieur à celui de l'huile d'*E. viridis* (**5.2%**), remarquablement inférieur à celle d'*E. oleosa* (**24.7%**) d'Australie [23] et inférieur aussi à celle d'*E. camaldulensis* (**28,3%**) du Maroc [134].

En revanche, notre huile présente une différence au niveau des composants majoritaires restants par rapport à ces trois huiles : c'est la présence d'un sesquiterpénol, globulol (10,9 %), une valeur proche de celle trouvée au niveau de la même espèce *E. globulus* prélevée en Allemagne en 2010, avec une teneur de (10.7%) [135]. L'huile diffère aussi par la présence de trans-pinocarvéol avec un pourcentage de (10.7%).

La composition chimique de l'huile a été comparée avec des huiles de la même espèce (*E. globulus*) prélevées de plusieurs pays, les composants majoritaires sont rassemblés dans le tableau V.6.

Le 1,8- cinéole reste le composé majoritaire de la plupart des HE analysées de la même espèce: sa teneur varie entre 14.5 et 83.8% ; notre échantillon prélevé de la région d'Attaf présente une teneur de cet oxyde de (48,6%), c'est une valeur moyenne intermédiaire entre celles des espèces figurées sur le tableau V.6.

Les échantillons provenant de Brésil [136], Chine [137] et Argentine [139] sont remarquablement plus riches en 1,8- cinéole, le taux de ce principe actif présente des variations relativement importantes d'une espèce à une autre, où les valeurs oscillent entre **63.4 et 83,8%**, pour cela les HE d'*E. globulus* sont très demandées ; le marché de ces produits est estimé à environ 1.500 tonnes/an [140].

Tableau V.6 : Composition majoritaires (% > 0.5) d'HE (à cinéole) de l'espèce *Eucalyptus globulus*

| HE (à cinéole) (% >5.0) | | | | | | | |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Origines | | | | | | | |
| Composé(%) | Brésil | Chine | Argentine | Allmagne | Inde | Algérie | Maroc |
| 1,8 cinéole | | | | | | | |
| –cinéole | 83.8 | 72.7 | 63.4 | 14.5 | 45.4 | 48.6 | 22.3 |
| – pinéne | | 9.2 | 13.7 | | | 9.7 | |
| aromadeudréne | | | | 31.1 | | | |
| β- pinéne | | | | | | | 5.2 |
| p-cyméne | | | | | 9.5 | | |
| γ-terpinéne | | | | | 8.8 | | |
| limonéne | 8.1 | | | | 17.8 | | 7.0 |
| viridiflor | | | 5.3 | | | | |
| globulol | | | | 10.6 | | 10.9 | |
| Trans-pinocarvéol | | | | | | 10.7 | |
| – terpinyl acetate | | 3.1 | | | | | |
| solanol | | | | | | | 6.0 |

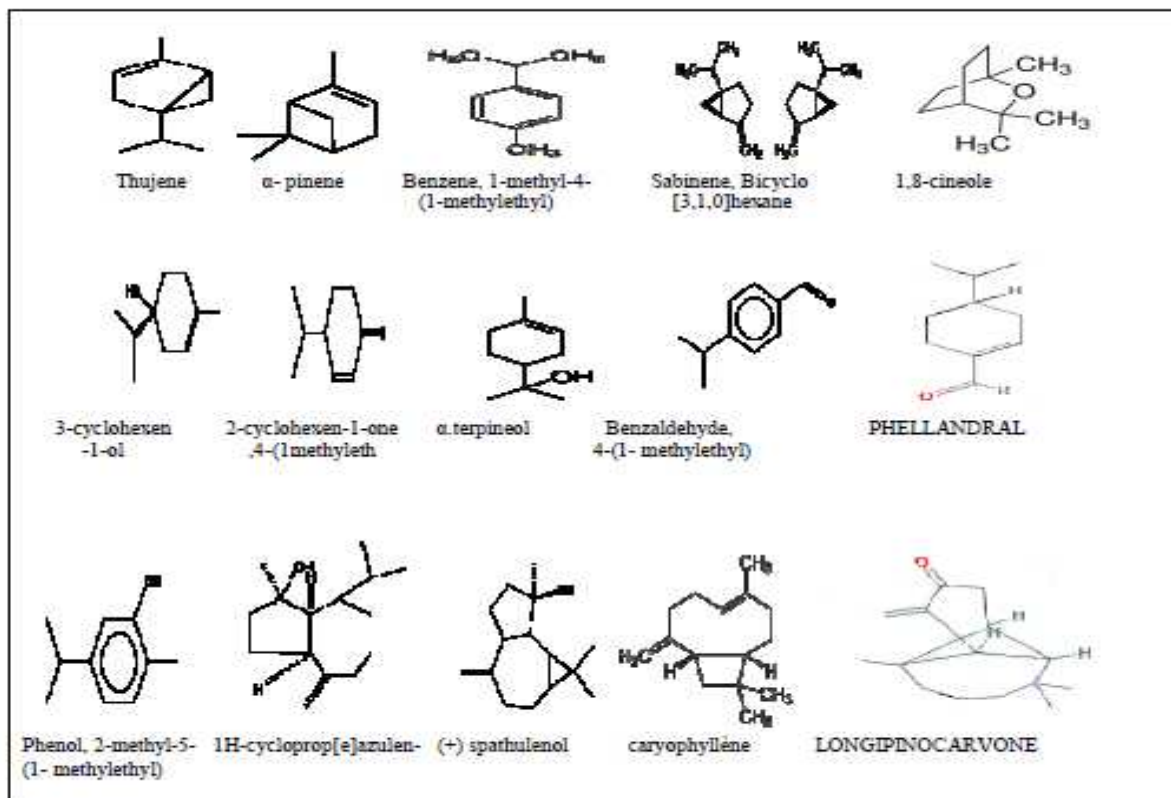


Figure V.10 : Structure chimique des compositions majoritaires d'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*.

V.8. Etude de l'activité antibactérienne

IV.8.1. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne

L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de nos huiles essentielles (a été faite sur 4 bactéries, par la méthode des aromatogrammes. Le pouvoir antimicrobien est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

Le diamètre moyen de la zone d'inhibition observée autour des disques imprégnés des huiles essentielles (d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L) pur, et leurs dilutions après 24 h d'incubation à 37°C° présenté par les figures (V.10 et V.11), ainsi que leurs pourcentages d'inhibitions sont résumés dans les tableaux (V.7 et V.8).

Tableau V.7: Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition et le pourcentage d'inhibition d'HE de d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis des quatre bactéries.

| Produit testés bactérie | Témoin (DMSO) | HE (pur) | HE (1/2) | HE (1/4) | HE (1/6) | HE (1/8) |
|---------------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Escherichia-coli | – | 45 | 32 | 25 | 22 | 21 |
| Staphylococcus aureus | – | 25 | 2 | – | – | 25 |
| Bacillus cereus. | – | 20 | 30 | 20 | 16 | 13 |
| Serratia marcescens (Ser) | – | 12 | 24 | 20 | 16 | 14 |

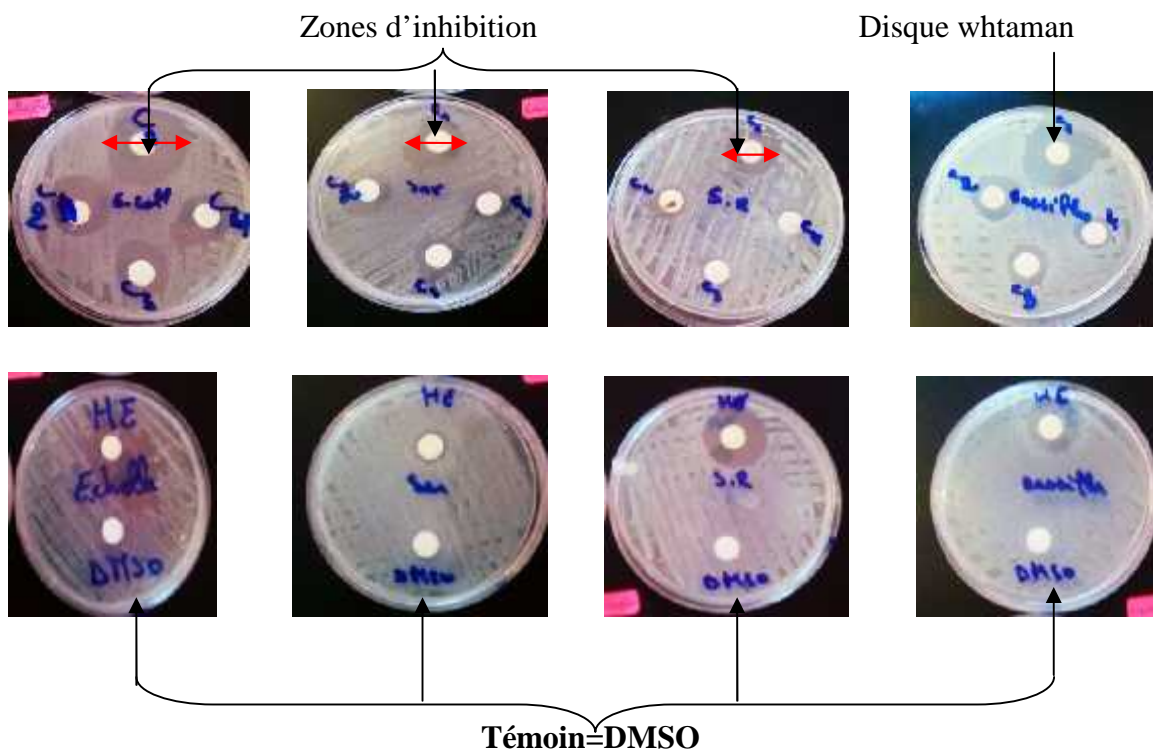


Figure V.11: Zones d'inhibition des HE d'*Eucalyptus globulus* L.

Tableau V.8 : Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition et le pourcentage d'inhibition d'HE de *Laurus nobilis* L. vis-à-vis des quatre bactéries.

| Produit testés bactérie | Témoin (DMSO) | HE (pur) | HE (1/2) | HE (1/4) | HE (1/6) | HE (1/8) |
|----------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Escherichia. coli | – | 19 | 19 | 15 | 28 | 31 |
| Staphylococcus aureus | – | 18 | 14 | 13 | 12 | 13 |
| Bacillus cereus. | – | 23 | 20 | 19 | 15 | 12 |
| Serratia marcescence | – | 30 | 13 | 14 | 12 | – |

Notes :(-): pas d'inhibition, **DMSO** : témoin, **HE** : huile essentielles.

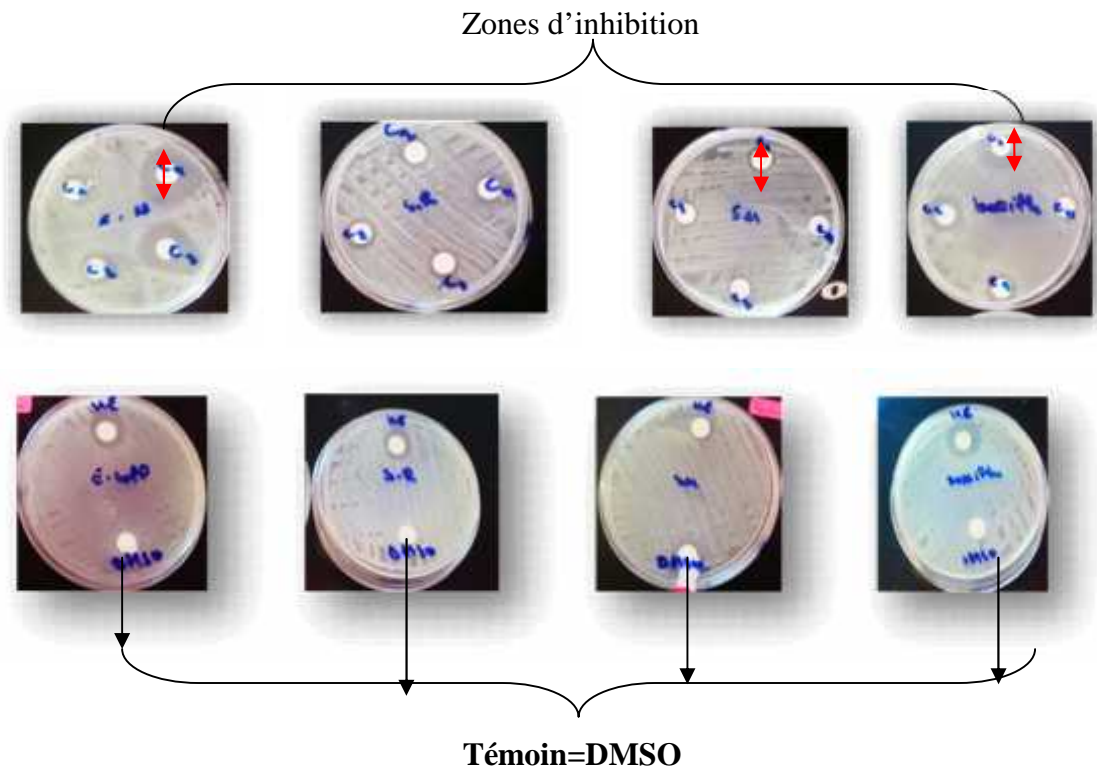


Figure V.12 : Zones d'inhibition des HE de *Laurus nobilis* L.

Les diamètres des zones d'inhibition(D) de la croissance microbienne sont classés en 5 Classes.

- ❖ Fortement inhibitrice lorsque : $D \geq 28$ mm de la zone d'inhibition (+++)
- ❖ Modérément inhibitrice lorsque : $28 \text{ mm} > D > 16$ mm de la zone d'inhibition (++)
- ❖ Légèrement inhibitrice lorsque : $16 \text{ mm} > D > 10$ mm de la zone d'inhibition(+)
- ❖ Non inhibitrice lorsque : $D < 10$ mm de la zone d'inhibition(-).

Tableau V.9 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés [141, 142].

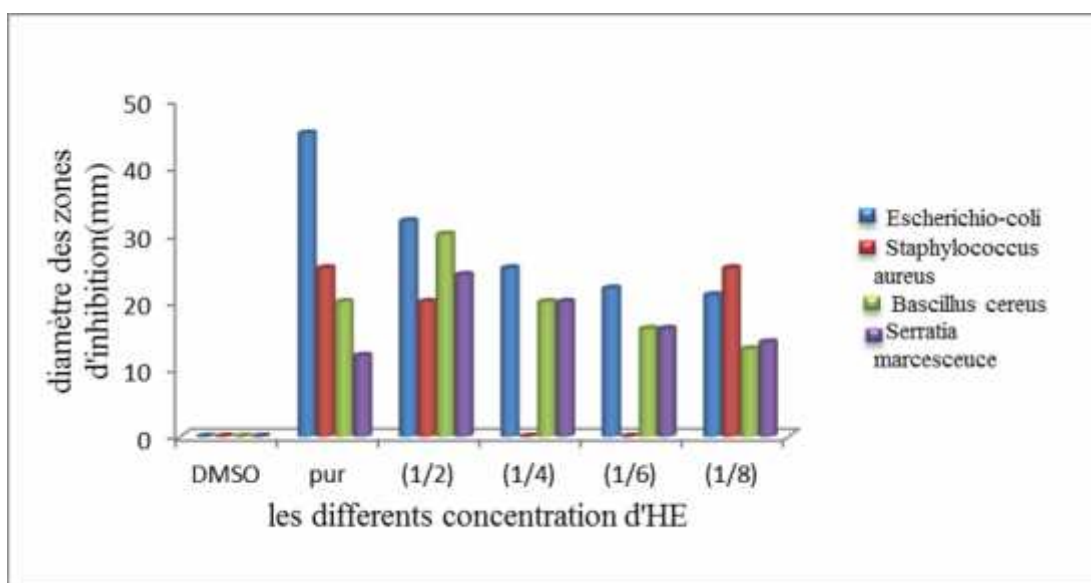
| Diamètres(D) de la zone d'inhibition (mm) | Transcription | Sensibilité du germe |
|---|---------------|----------------------|
| $D \geq 28$ mm | +++ | Extrêmement sensible |
| $28 \text{ mm} > D > 16$ mm | ++ | Très sensible |
| $16 \text{ mm} > D > 10$ | + | Sensible |
| $D < 10$ mm | - | Résistant |

Pour chaque boîte la mesure de la zone d'inhibition indique la sensibilité de ces germes, nous avons deux actions proposées à se produire :

- ✓ Soit une action bactéricide où nous ne remarquons aucune croissance microbienne autour des disques ;
- ✓ Soit une action bactériostatique, dont il y'a des zones d'inhibition autour des disques disposés sur la surface de milieu de culture ; Seules les bactéries montrant une sensibilité à nos huiles essentielles sont sélectionnées.

Tableau V.10 : Transcription des diamètres d'inhibition des dilutions huile essentielle de plante Eucalyptus.

| bactérie | Témoin (DMSO) | HE (pur) | C1 | C2 | C3 | C4 |
|----------------------------|---------------|----------|-----|----|----|----|
| Escherichia-coli | - | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| Staphylococcus Aureus(S.R) | - | ++ | ++ | - | - | ++ |
| Bacillus cereus. | - | ++ | +++ | ++ | ++ | + |
| Serratia marcescence | - | + | ++ | ++ | ++ | + |

**Figure V.13**: Diagramme de diamètres des zones d'inhibition (mm) de L en d'*Eucalyptus globulus* fonction des concentrations (1/2) (1/4) (1/6) (1/8).

D'après les résultats représentés dans les **Tableaux (V.10 et V.11)** et les **figures (V.12, V.13)** nous constatons que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a une très bonne activité antibactérienne par rapport au l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L, nous constatons aussi que *E.coli* et *Bacillus* sont les souches la plus sensible parmi les souches testés, et d'après l'échelle de mesure de l'activité antibactériennes des HE on dit que

l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* pur montre une action extrêmement sensible de la croissance de *E.coli* (**Gram -**) mais son action devient très sensible pour *Staphylococcus Aureus* (**Gram +**) et *Bacillus* et sensible pour *Serratia marcescense*

Tableau V.11 : Transcription des diamètres d'inhibition des dilutions huile essentielle De plante Laurier (*laurus nobilis*).

| bactérie | Témoin (DMSO) | HE (pur) | C1 | C2 | C3 | C4 |
|----------------------------|---------------|----------|----|----|-----|-----|
| Escherichia. coli | - | + | + | + | +++ | +++ |
| Staphylococcus Aureus (SR) | - | + | + | + | + | + |
| Bacillus cereus. | - | ++ | ++ | ++ | + | + |
| Serratia marcescense (Ser) | - | +++ | + | + | + | - |

L'extraite pur HE *Laurus nobilis* L montre une action extrêmement sensible de la croissance de *Serratia marcescense* Mais son action devient très sensible pour *Bacillus* et sensible pour *Staphylococcus Aureus* (**Gram +**) et *E.coli* (**Gram -**).

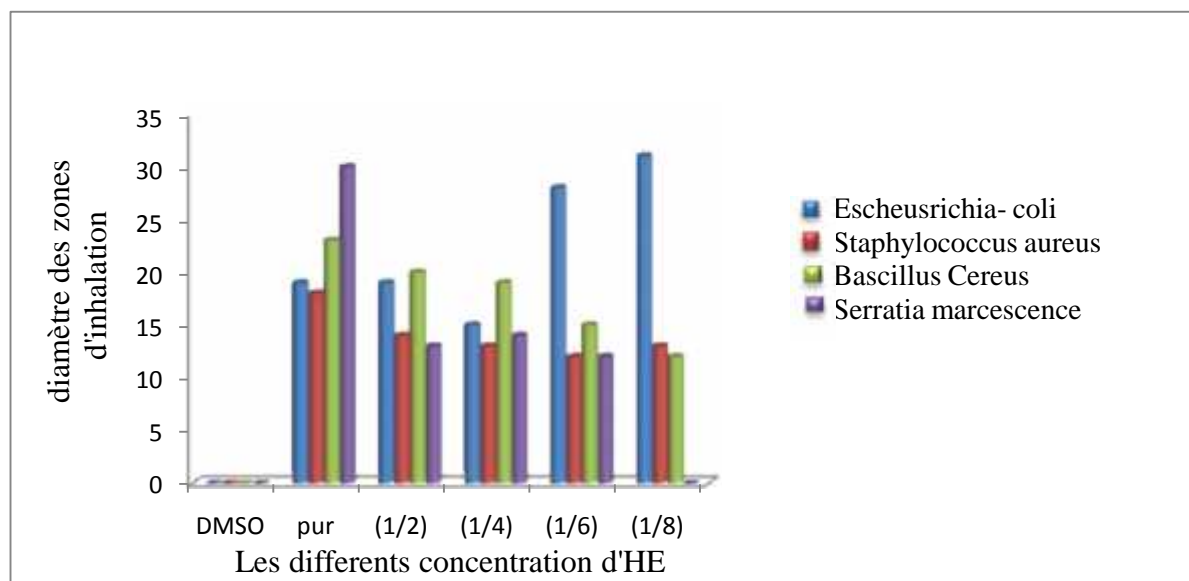


Figure V.14: Diagramme de diamètres des zones d'inhibition (mm) de *Laurus nobilis* L en fonction des concentrations (1/2) (1/4) (1/6) (1/8).

Ces résultats sont insuffisants pour donner une explication logique et finale du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* L.

Donc on détermine que l'*Eucalyptus globulus* ayant une bonne activité antibactérien para rapport *Laurus nobilis* L.

V.9. Activité antioxydant

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* est faite par plusieurs techniques. Ces méthodes se basent exclusivement sur la capacité réductrice ou piégeage des radicaux comme étant un indicateur de son potentiel antioxydant.

La mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des huiles essentielles des deux plantes testées a été réalisée par la méthode : le piégeage du radical libre DPPH.

V.9.1 Teste de DPPH

L'activité antiradicalaire a été évaluée en utilisant le DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante.

Le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH), un radical stable, violet en solution et présentant un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole appliqué en routine repose sur la disparition de ce maximum lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi la décoloration vers la couleur jaune.

V9.2. Calcul du pourcentage d'inhibition (I%)

Les mesures de l'inhibition d'absorbance du DPPH* provoquée par la présence de l'acide ascorbique (comme un puissant antioxydant naturel) ou par la présence des HE de *Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* après 30 minutes d'action ont permis de déterminer le pourcentage d'inhibition (I%) de chaque dilution.

Tableau V. 12 : Pourcentage d'inhibition (I%) d'huile d'*Eucalyptus globulus* , *Laurus nobilis* et de acide ascorbique

| Concentration 10 ² µg/ml | Pourcentage d'inhibition (I%) d'huile Eucalyptus | Pourcentage d'inhibition (I%) d'huile laurier | Pourcentage d'inhibition (I%) Acide ascorbique |
|--|--|---|--|
| 25 | 16.91 | 41.17 | 83.18 |
| 50 | 17.64 | 43.38 | 84.07 |
| 75 | 18.38 | 58.82 | 84.95 |
| 100 | 20.58 | 60.29 | 85.84 |

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit deux paramètres :

-) Le calcul d'IC₅₀: il définit la concentration efficace de l'huile qui cause la réduction de 50 % du DPPH en solution.
-) Les valeurs d'IC₅₀ des huiles étudiées ont été estimées, en utilisant la courbe de tendance polynomiale :

$$Y = ax^2 + bx + c$$

Avec :

Y : 50% (pourcentage de réduction de DPPH).

X : IC₅₀ (Concentration d'échantillon).

V.9.3. Calcule d'IC₅₀

Le IC₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH, Le IC₅₀ sont calculée graphiquement par la courbe donnant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en huile essentielle. La figure (V.13)

représente l'activité anti-radicalaire de l'acide ascorbique et d'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis* et de acide ascorbique.

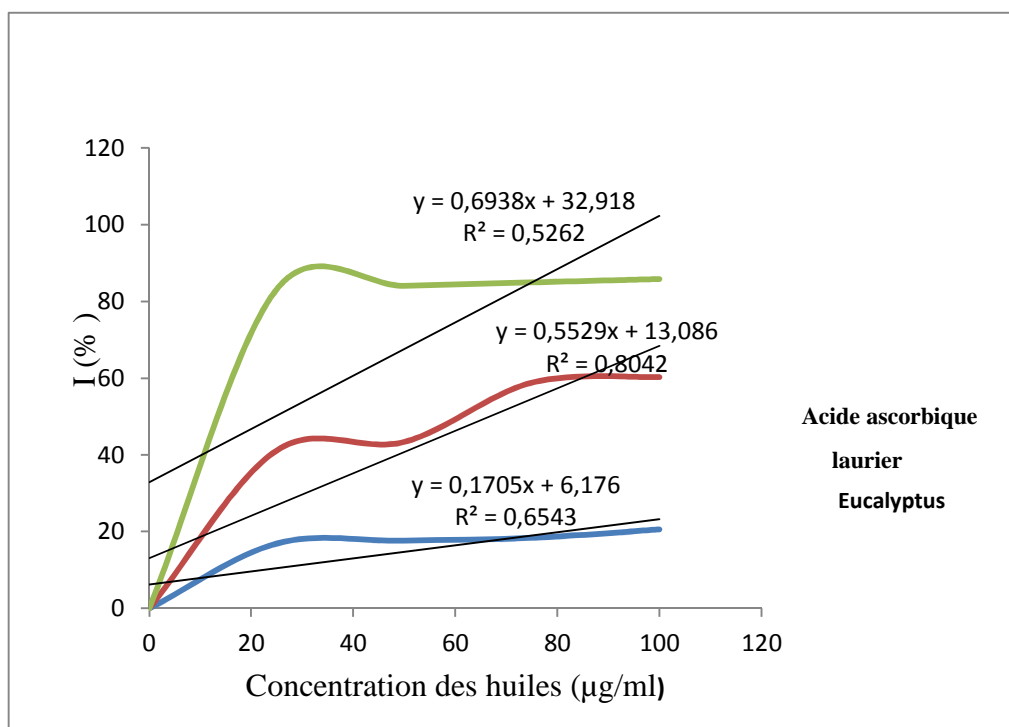


Figure V.15 : Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des l'huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis* et de acide ascorbique.

| | | | |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------------------|
| L'huile de Eucalyptus | y = 0.170 | x + 6.176 | R² = 0.654 |
| L'huile de laurier | y = 0.552 | x + 13.08 | R² = 0.804 |
| Acide ascorbique | y = 0.693 | x + 32.91 | R² = 0.526 |

Les résultats obtenus montrent que les plantes d'*Eucalyptus globulus* et *Laurus nobilis* présentent des activités antioxydants très importantes, avec des CI₅₀ de 257.788µg/ml et 66.884µg/ml respectivement. Ces activités sont inférieures à celles de l'acide ascorbique pris comme antioxydant de référence (CI₅₀= 24.66.µg/ml) cette faible valeur d' CI₅₀ indique une activité antioxydant forte.

Nous constatons aussi que *Laurus nobilis* a présenté une activité plus élevée que celle d'*Eucalyptus globulus*.

D'un autre côté, nous notons qu'il y a une corrélation entre la concentration des polyphénols et l'activité antioxydante, ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants capable d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules.

V.10. L'activité insecticide

Les résultats de mortalités moyennes, chez *Tribolium castaneum* traités par différents doses d'huile essentielle des deux plantes testée

V.10.1. Calcule des DL₅₀ et DL₉₀

Nous avons calculé les DL₅₀ et DL₉₀ au 5^{ème} jour après le traitement des **Tribolium castaneum** pour l'extrait de plante testée et ce au niveau des tous les types de traitement. Donc nous avons utilisé la droite de régression suivante : $y = a x + b$ (y : Probité et x : log doses), et pour un pourcentage de mortalité de 50% on a $y = 5$, et pour une mortalité de 90% donc $y = 6.28$.

Nous avons présentons les logarithmes décimaux des doses d'extrait de laurier et d'Eucalyptus et les probités des taux de mortalités cumulées au 5^{ème} jour chez les adultes de **Tribolium castaneum** par inhalation dans les tableaux suivantes

Tableau V.13 : Logarithme décimaux des doses de l’huile essentielle d’Eucalyptus et probités des taux de mortalité cumulées au 5^{ème} jour chez les adultes de *Tribolium castaneum*.

| 5 ^{ème} jour M | Mortalité | | | | Probité des%de mortalités cumulées | Logarithme décimal des doses |
|-------------------------------|-----------|-----|-----|----|--|------------------------------------|
| | T | R 1 | R 2 | M | | |
| D 1 | 0 | 60 | 70 | 65 | 5.39 | 1 |
| D2 | 0 | 80 | 60 | 70 | 5.52 | 1.30 |
| D 3 | 0 | 60 | 90 | 75 | 5.67 | 1.47 |
| D 4 | 0 | 90 | 100 | 95 | 6.64 | 1.60 |

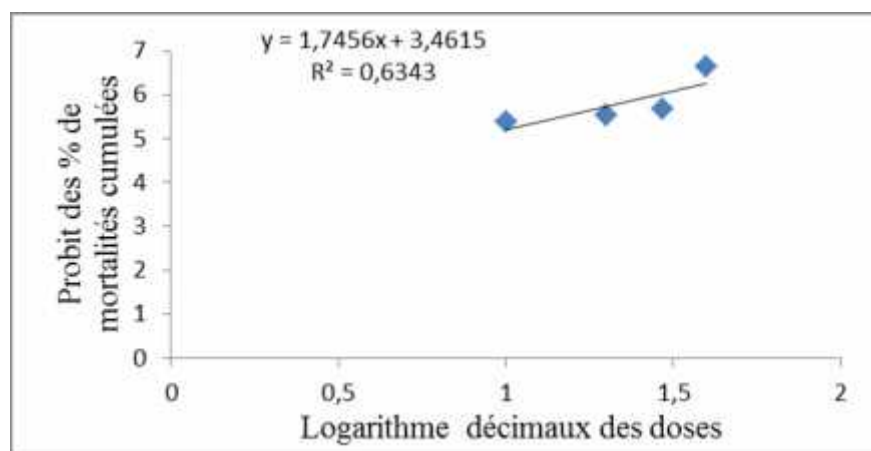


Figure V.16. Efficacité de laurier au 5^{ème} jour chez les adultes de *Tribolium castaneum*.

A partir de la droite de régression (Figure V.14), nous avons déterminé la DL₅₀ et DL₉₀ chez *T. castaneum*.

$$Y = 1.745 x + 3.461$$

Log DL₅₀ = 0.881 —————> DL₅₀ = 7.62 μl

Log DL₉₀ = 1.615 —————> DL₉₀ = 41.255 μl

Tableau V.14 : Logarithme décimaux des doses de l’huile essentielle de Laurier et probités des taux de mortalité cumulées au 5^{ème} jour chez les adultes de *Tribolium castaneum*.

| 5 ^{ème} jour | Mortalité | | | | Probité des % de mortalités cumulées | Logarithme décimal des doses |
|--------------------------|-----------|-----|-----|----|--------------------------------------|------------------------------|
| | T | R 1 | R 2 | M | | |
| D 1 | 0 | 50 | 40 | 45 | 4.87 | 1 |
| D2 | 0 | 60 | 60 | 60 | 5.25 | 1.30 |
| D 3 | 0 | 70 | 80 | 75 | 5.67 | 1.47 |
| D 4 | 0 | 90 | 80 | 85 | 6.04 | 1.60 |

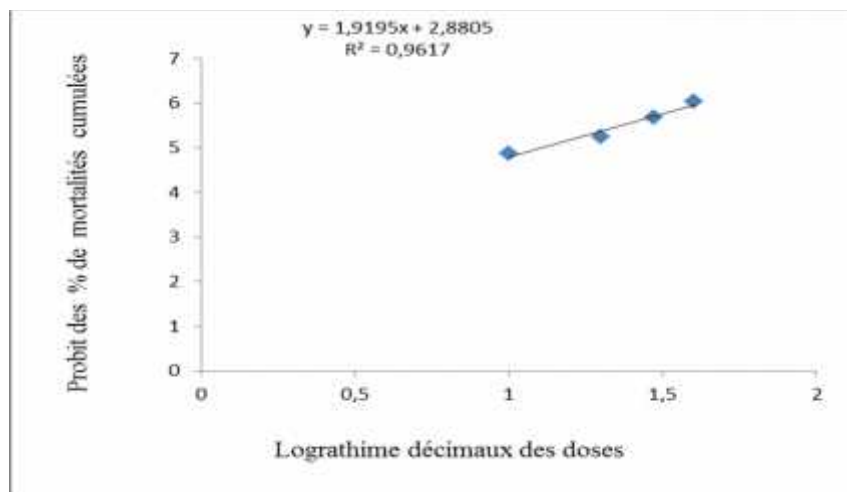


Figure V.17 : Efficacité de laurier au 5^{ème} jour chez les adultes de *Tribolium castaneum*.

A partir de la droite de régression (figure V.15) nous avons déterminé la DL₅₀ et DL₉₀ chez *T. castaneum*.

$$Y = 1.919 x + 2.880$$

$$\text{Log DL}_{50} = 1.104 \quad \longrightarrow \quad \text{DL}_{50} = 12.727 \quad \mu\text{l}$$

$$\text{Log DL}_{90} = 1.771 \quad \longrightarrow \quad \text{DL}_{90} = 59.123 \quad \mu\text{l}$$

V.10.2. Calcule la TL₅₀ et TL₉₀ (Traitement par inhalation).

Tableau V.15 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D1 de l'huile d'Eucalyptus chez les adultes de Tribolium castaneum.

| D 1 Jours | Mortalité | | | | Probité des % de mortalités cumulees | Logarithme décimal des temps |
|--------------|-----------|-----|-----|----|--------------------------------------|------------------------------|
| | T | R 1 | R 2 | M | | |
| J 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | / | 0 |
| J 2 | 0 | 20 | 10 | 15 | 3.96 | 0.30 |
| J 3 | 0 | 30 | 20 | 25 | 4.33 | 0.47 |
| J 4 | 0 | 50 | 60 | 55 | 5.13 | 0.60 |
| J 5 | 0 | 60 | 70 | 65 | 5.39 | 0.69 |

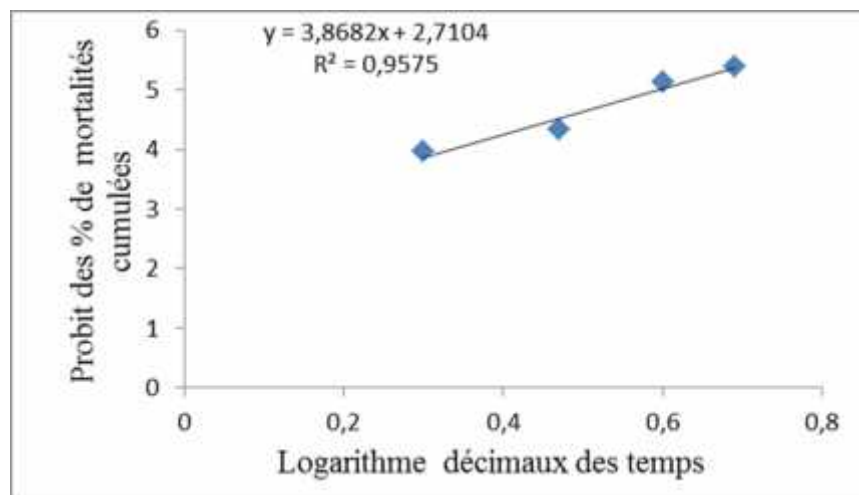


Figure V.18 : Efficacité de la D₁ de l'huile d'Eucalyptus sur les adultes de Tribolium castaneum.

$$Y = 3.868 x + 2.710$$

Log TL₅₀ = 0.592 \longrightarrow TL₅₀ = 3.909 J

Log TL₉₀ = 0.922 \longrightarrow TL₉₀ = 8.374 J

Pour tuée 50% de la population des adultes de *Tribolium castaneum* le temps létal est de 3.909 jours. Et pour tuée 90% de cette population traitée par l’huile essentielle d’Eucalyptus par le mode de traitement inhalation il faut 8.374 jours.

Tableau V.16 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D2 de l’huile d’Eucalyptus chez les adultes de *Tribolium castaneum*.

| D 2 Jours | Mortalité | | | | Probité des%de mortalités cumulees | Logarithme décimal des temps |
|--------------|-----------|-----|-----|----|---|------------------------------------|
| | T | R 1 | R 2 | M | | |
| J 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | / | 0 |
| J 2 | 0 | 20 | 10 | 15 | 3.96 | 0.30 |
| J 3 | 0 | 30 | 30 | 30 | 4.48 | 0.47 |
| J 4 | 0 | 60 | 40 | 50 | 5 | 0.60 |
| J 5 | 0 | 80 | 60 | 70 | 5.52 | 0.69 |

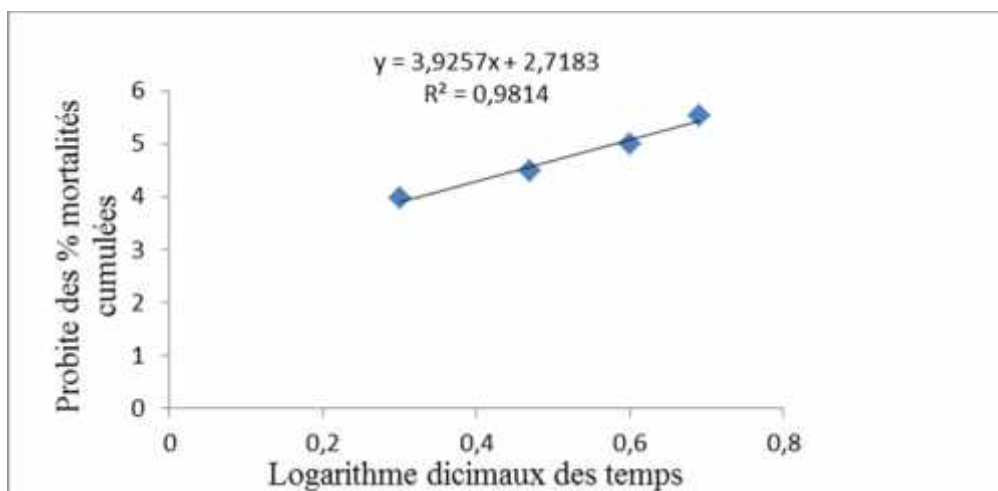


Figure V.19 : Efficacité de la D₂ de l’huile d’Eucalyptus sur les adultes de *Tribolium castaneum*.

$$Y = 3.925x + 2.718$$

Log TL₅₀ = 0.581 —————> TL₅₀ = 3.814 J

Log TL₉₀ = 0.907 —————> TL₉₀ = 8.082 J

Pour tuée 50% de la population des adultes de *Tribolium castaneum* le temps létal est de 3.814jours. Et pour tuée 90% de cette population traitée par l’huile essentielle d’Eucalyptus par le mode de traitement inhalation il faut 8.082 jours.

Tableau V.17 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D3 de l’huile d’Eucalyptus chez les adultes de *Tribolium castaneum*.

| D 3 Jours | Mortalité | | | | Probité des%de mortalités cumulées | Logarithme décimal des temps |
|--------------|-----------|-----|-----|----|---|------------------------------------|
| | T | R 1 | R 2 | M | | |
| J 1 | 0 | 10 | 10 | 10 | 3.72 | 0 |
| J 2 | 0 | 30 | 20 | 25 | 4.33 | 0.30 |
| J 3 | 0 | 50 | 50 | 50 | 5 | 0.47 |
| J 4 | 0 | 70 | 80 | 75 | 5.67 | 0.60 |
| J 5 | 0 | 80 | 90 | 85 | 6.04 | 0.69 |

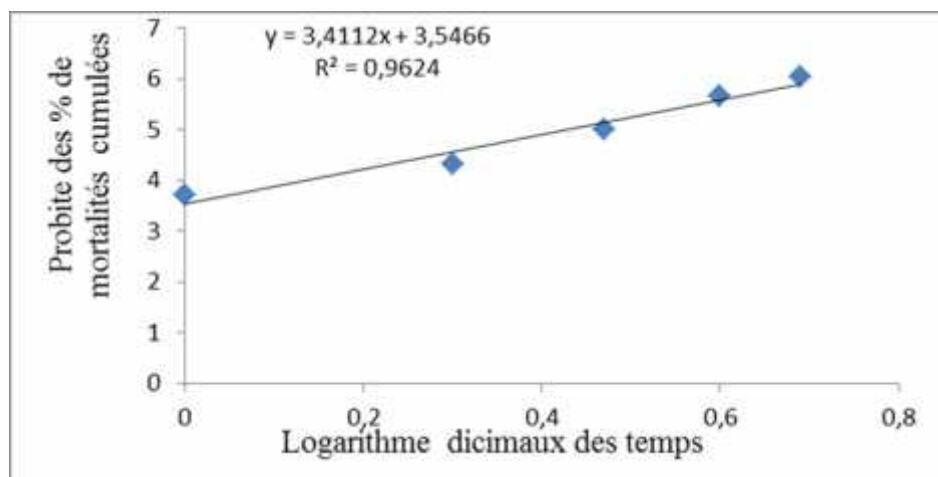


Figure V.20 : Efficacité de la D₃ de l’huile d’Eucalyptus sur les adultes de *Tribolium castaneum*.

$$Y = 3.411x + 3.546$$

$$\text{Log TL}_{50} = 0.426 \longrightarrow \text{TL}_{50} = 2.669 \text{ J}$$

$$\text{Log TL}_{90} = 0.801 \longrightarrow \text{TL}_{90} = 6.332 \text{ J}$$

Pour tuée 50% de la population des adultes de *Tribolium castaneum* le temps léthal est de 2.669 jours. Et pour tuée 90% de cette population traitée par l'huile essentielle d'Eucalyptus par le mode de traitement inhalation il faut 6.332 jours.

Tableau V.18 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D4 de l'huile d'Eucalyptus chez les adultes de *Tribolium castaneum*.

| D 4 Jours | Mortalité | | | | Probité des de mortalités cumulées | Logarithme décimal des temps |
|--------------|-----------|-----|-----|----|---|------------------------------------|
| | T | R 1 | R 2 | M | | |
| J 1 | 0 | 30 | 40 | 35 | 4.61 | 0 |
| J 2 | 0 | 50 | 50 | 50 | 5 | 0.30 |
| J 3 | 0 | 80 | 70 | 75 | 5.67 | 0.47 |
| J 4 | 0 | 90 | 80 | 85 | 6.04 | 0.60 |
| J 5 | 0 | 90 | 100 | 95 | 6.64 | 0.69 |

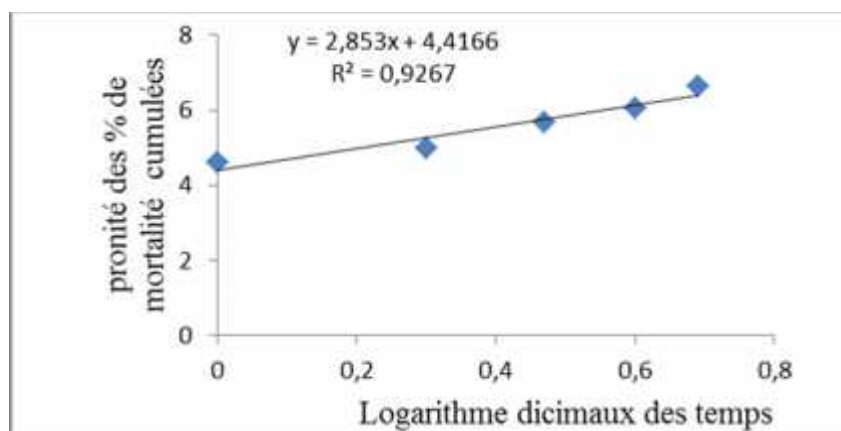


Figure V.21 : Efficacité de la D₄ de l'huile d'Eucalyptus sur les adultes de *Tribolium castaneum*

$$Y=2.853 x + 4.416$$

$$\text{Log TL}_{50} = 0.259 \longrightarrow \text{TL}_{50} = 1.816 \text{ J}$$

$$\text{Log TL}_{90} = 0.653 \longrightarrow \text{TL}_{90} = 4.501 \text{ J}$$

Pour tuée 50% de la population des adultes de *Tribolium castaneum* le temps létal est de 1.816 jours. Et pour tuée 90% de cette population traitée par l'huile essentielle d'Eucalyptus par le mode de traitement inhalation il faut 4.501 jours.

Tableau V.19 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D1 de l'huile du laurier chez les adultes de *Tribolium castaneum*.

| D 1 Jours | Mortalité | | | | Probité des% de mortalités cumulées | Logarithme décimal des temps |
|--------------|-----------|-----|-----|----|--|------------------------------------|
| | T | R 1 | R 2 | M | | |
| J 1 | 0 | 0 | 0 | / | 0 | 0 |
| J 2 | 0 | 10 | 0 | 10 | 3.72 | 0.30 |
| J 3 | 0 | 20 | 10 | 15 | 3.96 | 0.47 |
| J 4 | 0 | 40 | 30 | 35 | 4.59 | 0.60 |
| J 5 | 0 | 50 | 40 | 45 | 4.87 | 0.69 |

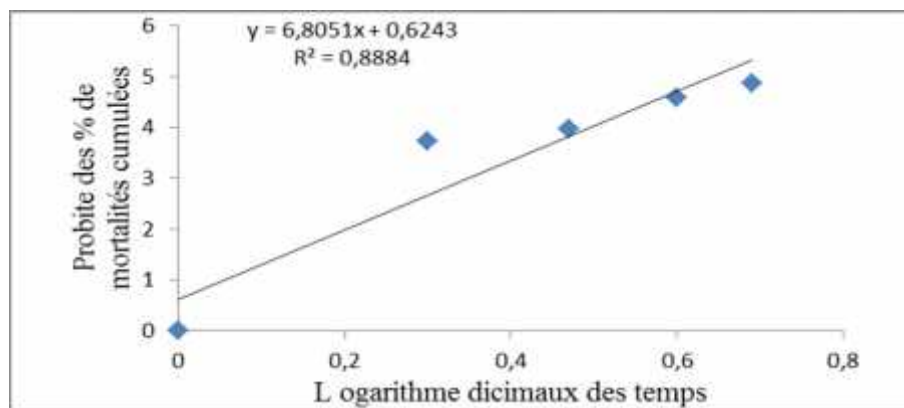


Figure V.22: Efficacité de la D1 de l'huile de laurier sur les adultes de *Tribolium castaneum*.

$$Y = 6.805x + 0.624$$

$$\text{Log TL}_{50} = 0.643 \longrightarrow \text{TL}_{50} = 4.396 \text{ J}$$

$$\text{Log TL}_{90} = 0.831 \longrightarrow \text{TL}_{90} = 6.779 \text{ J}$$

Pour tuée 50% de la population des adultes de *Tribolium castaneum* le temps léthal est de 4.396 jours. Et pour tuée 90% de cette population traitée par l'huile essentielle de Eucalyptus par le mode de traitement inhalation il faut 6.779 jours.

Tableau V.20 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D2 de l'huile de laurier chez les adultes de *Tribolium castaneum*.

| D 2 Jours | Mortalité | | | | Probité des%de mortalités cumulees | Logarithme décimal des temps |
|--------------|-----------|-----|-----|----|---|------------------------------------|
| | T | R 1 | R 2 | M | | |
| J 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | / | 0 |
| J 2 | 0 | 10 | 10 | 10 | 3.72 | 0.30 |
| J 3 | 0 | 30 | 20 | 25 | 4.33 | 0.47 |
| J 4 | 0 | 50 | 40 | 45 | 4.87 | 0.60 |
| J 5 | 0 | 60 | 60 | 60 | 5.25 | 0.69 |

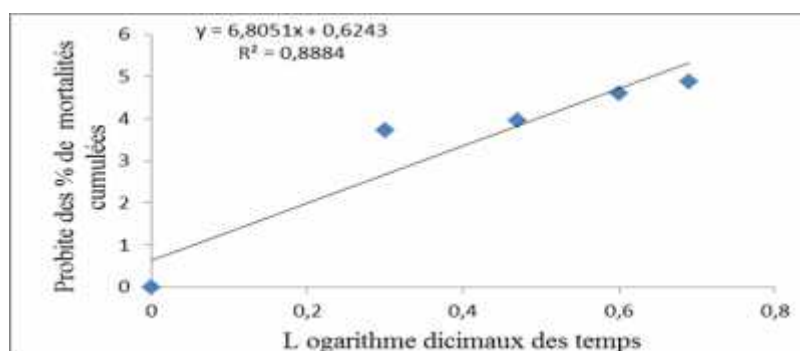


Figure V.23 : Efficacité de la D₂ de l'huile de Laurier sur les adultes de *Tribolium castaneum*.

$$Y = 6.805x + 0.624$$

$$\text{Log TL}_{50} = 0.643 \longrightarrow \text{TL}_{50} = 4.395 \text{ J}$$

$$\text{Log TL}_{90} = 0.831 \longrightarrow \text{TL}_{90} = 6.776 \text{ J}$$

Pour tuée 50% de la population des adultes de Tribolium castaneum le temps léthal est de 4.395 jours. Et pour tuée 90% de cette population traitée par l'huile essentielle d'Eucalyptus par le mode de traitement inhalation il faut 6.776 jours.

Tableau. V.21 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D3 de l'huile de Laurier chez les adultes de Tribolium castaneum.

| D 3 Jours | Mortalité | | | | Probité des % de mortalités cumulées | Logarithme décimal des temps |
|--------------|-----------|-----|-----|----|---|------------------------------------|
| | T | R 1 | R 2 | M | | |
| J 1 | 0 | 20 | 20 | 20 | 4.16 | 0 |
| J 2 | 0 | 50 | 30 | 40 | 4.75 | 0.30 |
| J 3 | 0 | 60 | 50 | 55 | 5.13 | 0.47 |
| J 4 | 0 | 60 | 60 | 60 | 5.25 | 0.60 |
| J 5 | 0 | 70 | 80 | 75 | 5.67 | 0.69 |

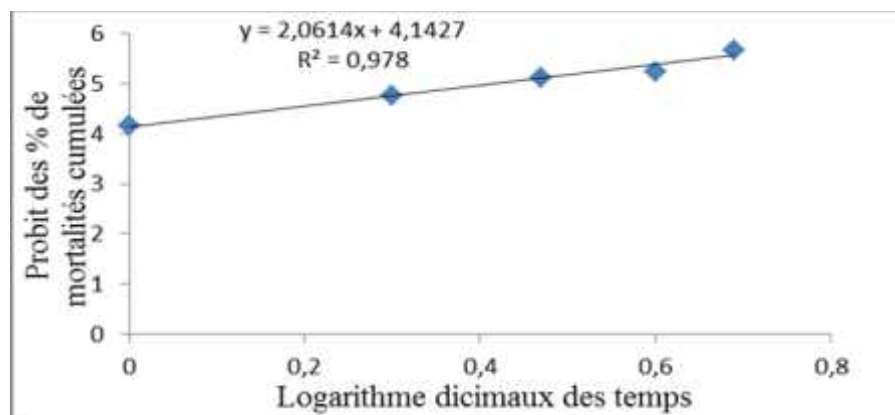


Figure V.24 : Efficacité de la D₃ de l'huile de Laurier sur les adultes de Tribolium castaneum.

$$Y=2.61 x + 4.142$$

$$\text{Log TL}_{50} = 0.328 \longrightarrow \text{TL}_{50} = 2.132 \text{ J}$$

$$\text{Log TL}_{90} = 0.819 \longrightarrow \text{TL}_{90} = 6.594 \text{ J}$$

Pour tuée 50% de la population des adultes de Tribolium castaneum le temps légal est de 2.132 jours. Et pour tuée 90% de cette population traitée par l’huile essentielle d’Eucalyptus par le mode de traitement inhalation il faut 6.594 jours.

Tableau V.23 : Logarithme décimaux des temps et probités des taux de mortalité cumulée pour la D4 de l’huile de Laurier chez les adultes de Tribolium castaneum.

| D 4 Jours | Mortalité | | | | Probité des % de mortalités cumulées | Logarithme décimal des temps |
|--------------|-----------|-----|-----|----|---|------------------------------------|
| | T | R 1 | R 2 | M | | |
| J 1 | 0 | 20 | 30 | 25 | 4.29 | 0 |
| J 2 | 0 | 30 | 50 | 40 | 4.75 | 0.30 |
| J 3 | 0 | 40 | 60 | 50 | 5 | 0.47 |
| J 4 | 0 | 60 | 70 | 65 | 5.39 | 0.60 |
| J 5 | 0 | 90 | 80 | 85 | 6.04 | 0.69 |

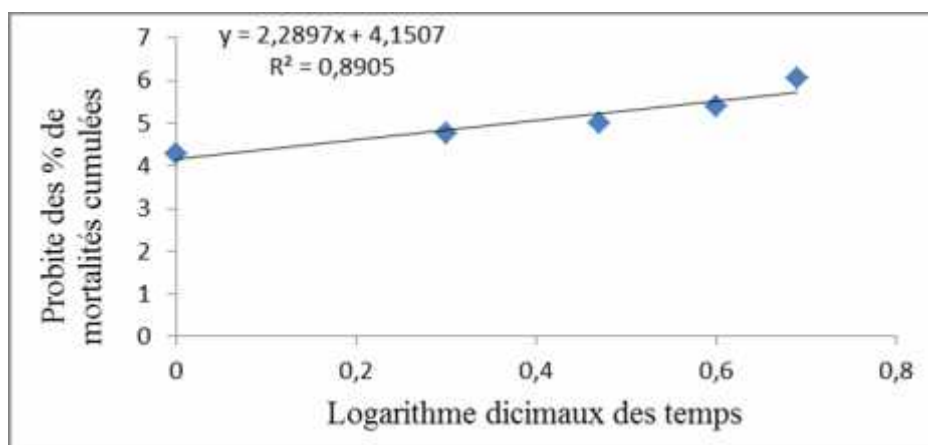


Figure V. 25 : Efficacité de la D₄ de l’huile de Laurier sur les adultes de Tribolium castaneum.

$$Y = 2.289 x + 4.150$$

$$\text{Log TL}_{50} = 0.371 \quad \longrightarrow \quad \text{TL}_{50} = 2.351 \quad \text{J}$$

$$\text{Log TL}_{90} = 0.930 \quad \longrightarrow \quad \text{TL}_{90} = 8.522 \quad \text{J}$$

Pour tuée 50% de la population des adultes de **Tribolium castaneum** le temps léthal est de 2.351 jours. Et pour tuée 90% de cette population traitée par l'huile essentielle d'Eucalyptus par le mode de traitement inhalation il faut 8.522 jours.

Conclusion générale

Conclusion générale

Au terme de notre étude qui a porté sur l'activité insecticide d'huiles essentielles obtenue des deux plantes *Eucalyptus globulus* et *laurus nobilis* L. de Attaf de la région (Ain defla). Différentes analyses sont appliquées à ces plantes : extraction des huiles essentielles, , évaluation de leurs effet antioxydant par les méthodes analytiques (DPPH), la détermination de leur pouvoir antibactérien sur des souches pathogènes et multi résistantes : il s'agit de *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus subtilis*, et *Serratia marcescens* et enfin le test de leurs pouvoir insecticides sur les adultes ravageurs de *Tribolium castaneum*

A partir des résultats obtenus, nous pouvons résumer les conclusions issues de cette étude comme suit :

) L'obtention des huiles essentielles par hydrodistillation reste une méthode simple et efficace, et donne un rendement intéressant. Le calcul de rendement maximal en huile essentielle de notre plantes nous a révélé une valeur de (0.65%) et la CPG/SM a permis d'identifier 20 composés dont 1, 8-cinéole (**48,6%**), -pinène (9,7%) globulol (10,9 %), *trans*-pinocarveol (10,7 %) et -terpineol (6,6%) sont les composés majoritaires.

Pour *laurus nobilis* avec un rendement de 0,58 % son HE est constitué de 22 composants dont 1,8-cineole (**45,36%**), Bornylene (17,25%), Linalool (8,13%), et de Sabinene (7,48%) sont les constituants principaux.

) caractérisations organoleptiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus (globulus)* et *laurus Nobilis* sont des liquides à température ambiante, de couleur jaune et une odeur agréable.

) Les caractérisations physicochimiques effectuées ont pu renseigner sur la qualité et la pureté de nos huiles brutes.

) L'activité antibactérienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion en disque et la méthode de dilution en milieu liquide, les obtenus à partir de l'étude de l'effet antimicrobienne des huiles présentent un pouvoir antibactérien assez important sur la souche microbienne, *Escherichia-coli*, *Bacillus cereus*, *serratia* et *staphylococcus*, les germes *Escherichia-coli* et *staphylococcus* sont très sensibles lorsque occupée bonne zone d'inhibition 45mm,20 mm pour *Eucalyptus globulus* et 19mm,20mm pour *laurus nobilis* .

) L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les flavonoïdes à piéger les radicaux libres. Nous remarquons que l'activité antioxydante du piégeage du DPPH de l'huile essentielle s'est traduite par des Les valeurs d'IC₅₀ ont été estimées à (66.88 ; 257.788) mg / ml pour les huiles de

Conclusion générale

Laurier (*laurus nobilis*), Eucalyptus (*globulus*) respectivement. Alors que celle de témoin positif l'acide ascorbique de 24.660 mg / ml

J) l'étude du pouvoir anti - insecte par la méthode de traitement par d'inhalation qui a porté sur les doses de 10 μ l, 20 μ l, 30 μ l, 40 μ l, montrent que les effets insecticides des huiles essentielles étaient en fonction de la nature des huiles , des doses utilisées , du temps d'exposition et la partie de la plante . Chez Eucalyptus est donnée plus mortalité par rapport la mortalité de l'aurus nobilis avec un taux de 100% en dose $D_4(40\mu l)$ après 120h d'exposition. Chez l'aurus nobilis maximum de mortalité est ou bout de 5^e jour d'expression. Le temps et la dose l'étale varient selon les plantes, les doses appliquées et le temps d'exposition, le plus représente c'est Eucalyptus globulus avec un T_5 de 1.81 jour et T_9 de 4.50 jour par traitement d'inhalation avec une D_5 de 7.62 μ l et D_9 de 41.25 μ l. Pour laurus nobilis en respectivement $T_5 = 2.35$ jour, $T_9 = 8.52$ jour et $D_5 = 12.27\mu l$, $D_9 = 59.12\mu l$.

Les résultats obtenus montrent que les huiles essentielles testés se sont avérées efficaces et ont donne un effet insecticide sur *Tribolium castaneum*.

L'activité biologique d'une huile ou extrait est liée à sa composition chimique au groupe fonctionnels des composés majoritaire et leurs effets synergiques.

A la lumière de ces résultats il ressort que les huiles brutes d'Eucalyptus globulus et laurus nobilis :

- Peuvent être utilisée comme antioxydant naturels dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.
- l'utilisation ces plantes aromatiques comme des agents antimicrobiens et comme insecticide naturel.

Notre recommandation à la population repose sur l'utilisation raisonnable des plantes médicinales ; ces substances thérapeutiques nécessitent une certaine attention et prudence afin d'éviter la méconnaissance qui engendre le risque de confusion ainsi qu'un usage abusif de ces plantes peut conduire à des effets indésirables et parfois même néfastes pour la santé humaine.

Conclusion générale

Cependant, malgré leurs importances, ces résultats restent partiels et d'autres travaux sur ces plantes s'imposent aux niveaux pharmacologiques et chimiques, il sera intéressant à l'avenir:

- D'étudier d'autres propriétés biologiques de ces plantes, à savoir les propriétés anti-inflammatoires, antivirales et autres.
- De tester les composés identifiés individuellement en faisant appel à des tests pharmacologiques *in vivo*.
- De vérifier l'absence d'effets toxiques de ces composés.

Référence Bibliographique

Référence Bibliographique

[1]**Lafon,J,P , Tharaud-Prayer,1991** : C. et Lévy, G.«Biologie des plantes cultivées. Tome 1 : organisation, physiologie de la nutrition», Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris 1998, p 240 ;b) salle, J.L. «Le Totum en phytothérapie : Approche de phyto-biothérapie»,Ed.Frison-Roche,Paris ,p,239.

[2]**Bakkali, F ;Averbeck, S, Averbeck, D, 2008** :.and Idaomar,M.Food Chem.Toxicol.,46,446-475.

[3]**Teles Andrade,B,F,M ;Barbosa,L, N , 2014** : da Silva Probst,I, and Fernandes,junior A,J. Essent. Oil Res., 26,34-40.

[4] **El Abed, D. et Kambouche, N.2003**:« Les huiles », Edition Dar El Gharbb) Burt, S,Int.J. Food Microbiol.2004, 94,223-253.

[5]**DaCruz-Cabral L, 2013**: Fernandez-Pinto,V, ;Patriarca, A, Int.J.Food Microbiol.2013,166,-1-14.

[6]**Kanko C, ; Sawaliho B.E,-H , ;kone S , ;koukoua G.and N’Gussan Y.T , (2004)** :Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*,*Cymbopogon citratus* *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ;Comptes Rendus Chimie 7(10-11),1039-1042.

[7]**Bernard, T., Perineau, F., Bravo, R., Delmas, M., &Gaset, A. (1988)** : Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie. Information chimie, pp. 179-184 ».

Bernath, B., (1991). Hethelyi, Herba Hung.

[8]**Teuscher, E ; Anton, R ; &Lobstein, A. (2005)** : Plantes aromatiques : Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris: Tec & DOC ».

[9]**Belaiche P., 1979** : Traité de Phytothérapie et d’Aromathérapie. Tome 1.l’aromatogramme. Ed. Maloine. Paris.

[10]**Valnet J. (1984)** : Aromathérapie: Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris, 544 p.

[11]**Wichtel M. et Anton R. (1999)** : plantes thérapeutique : tradition, pratiques officinales, science et thérapeutique .Ed. Technique et documentation, paris.

[12]Jouaults.,2012 :La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité .thèse de doctorat d'état en pharmacie. Université de lorraine .faculté de pharmacie.france.137p.

[13]Guignard J.L. ,1995.Abrégé de botanique .Ed. Masson, 285 p.

[14]Houel E, 2011. Etude des substances bioactives issues de la flore amazonienne. Analyse de préparation phytothérapeutiques à base de Quassia amara L. (simaroubaceae) et psidiumacutangulumD.C. (Myrtaceae) utilisées en Guyane Française pour une indication antipaludique. Identification et analyse métabolique d'huiles essentielle à activité antifongique. Thèse de doctorat en chimie des substances. Université des Antilles et de la Guyane. 220P.

[15]]Rai M. K., Acharya D. and Wadegaokar., 2003. Plant derived-antimycotics:Potential of Asteraceous plants, in: Plant-derivedantimycotics: Current Trends and Future prospects. Haworth press, N-York, Londin, Oxford, pp: 165-185.

[16]Belaiche P., 1979 : Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome 1.l'aromatogramme. Ed. Maloine. Paris.

[17] Capo M., Courilleeau V., et Valette C., 1990. Chimie des couleurs etDesodeurs. Culture et techniques, 204 p.

[18] Guignard J.L. 2000.biochimie végétale. Masson,paris,166.

[19] Dale Poulter, C ;Marscle, L ; Hughers,J.M. et Argyle,J.C.J.Am. Soc. (1977) :99 ,3823.

[20] Iserin, P .2001 : Encyclopédie des plantes médicinales, in Encyclopédie des plantes médicinales, L. Londres, Editor. p. 116, 225-226.

[21] Teisseire P.J(1991) : Chimie des substances odorantes. Tec et Doc, lavoisier, paris, 480p [22]Quezel, P. and S. Santa, 1962 : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, C.N.R.S, Editor. p. 565.

[23]Kunle, O, j.Okogum, 2003.Antimicrobial: Activity of vari ous extract and carvacrolfromlippia multi Flora leaf extract phymedicine .Vo110.59-61p].

[24] **Piochon, M., 2008** : Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Proquest.

[25] **Brunneton J., 1993** : Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. Edition. Technique et documentaire, 3eme édition. 484, 489, 548, 555,634 p.

[26] **Özcan M. et Chachat J-C., 2004**: Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing Wild in Turkey. Bulg. J. Plant Physiol. 30(3-4): 68-73.

[27] **Svoboda et Hampson 1999, In Zohra M., 2006** : Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen – Thèse de l'Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen –Faculté des Sciences, 150p

[28] **Smallfield B., 2001**: introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crops and Food Research. Number 45, P4.

[29] **Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. and El-Soda, M. (2004)**: Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. Food Microbiology. 2004, p 715–725.

[30] **Ruasmadiedo, P., Tuinier, R., Kanning, M. and Zoon, P. 2002**: Role of exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. International Dairy Journal., 689-695.

[31] **Benbouli, 2005**) : « Valorisation des extraits des plantes aromatiques et médicinales de *Mentha rotundifolia* et *thymus vulgaris* » , (Mémoire de magistère).154P

[32] **Lucchesi, M.-E.,** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. 2005. Thèse de Doctorat, Université de la Réunion.

[33] **Sayyah, M., J. Valizadeh, and M. Kamalinejad, 2002**: Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole- and maximal electroshock-induced seizures. Phytomedicine, **9**(3): p. 212-6.

[34] **Besombes C 2008** : Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo- mécanique d'herbes aromatiques .Application généralisées .thèse de doctorat de l'Université de Rochelle, France.

[35] **Lurof, et Brillouet J.M. (2005)**: leaf volatile compounds of six citrus somatic callus tetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, sweet orange and grapefruit .journal of agricultural and food chemistry, 53,2224-2230.

[36] **Padrini F. ; Lucheroni M.T.1996** : Le grand livre des huiles essentielles.Ed.de Vecchi. [37] **Guenter E, 1982**: the mode of recovery of the essential oil from the cells of plant materials during steam distillation. Int. Cong. Of ess. Oils, N°7,242p.

[38] **LAYADI et SOUADKI, 1999** : Contribution à l'étude des huiles essentielles de deux Plantes : *Ocimum basilicum* L. et *Santolinchama ecyparissus*L. Thèse d'ingénieur en agronomie institut national agronomique el harach.

[39] **Sallé, Jeanluc ; 1991** : Les huiles essentielles: Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympaticothérapie. Edition Frison-Roche 18, Rue Dauphine 75006 Paris. P 9-45

[40] **Bruneton, J.1999** : pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^{ème} édition. Ed. Technique et Documentation p: 485-505.

[41] **Zlotorzynski A. 1995**: Microwave assisted extraction of essential oils from vegetal material. Anal. Chem. 25(1). P 43-76.

[42]: **winston-salem(usa),1995**: brianm.l the isolation of aromatic materials from plant products, r.j. Reynolds tobacco company,.57148.

[43]: **mompon b.** quel avenir commercial pour les produits obtenus par les nouvelles Technologies d'extraction: co2, micro-ondes, ultrasons, nouveaux solvants, 4^{ième} rencontre Internationale de nyons, 1994p. 149-166.

[44] **Balakeway. J., Balerno. 1987** : Pour la science. Institut des renseignements scientifiques et techniques.Paris.

[45] **Banthorpe D.V ET Charwood B.V., 1972.** Chemistry of terpenes and

terpenoides, Ed. A.A. Newman ; Academic Press, London and N. York ; 1972. Pp337-374.

[46] **Liddle. P., Smedip, A.P ; 1981:**Parfum, Cosmétique et Arome. P 110-112-117

[47] **Pibiri M.C., (2006) :** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat .polytechnique fédérale de Lausanne.

[48]**Lahlou M., 2004:** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phyto therapy Research, 18, pp : 435-448.

[49] **Richard F. et Peyron F., 1992 :** Manuel des corps gras, Paris, Ed : Lavoisier, Tec. et Document., pp : 12228-1242.

[50]**Boyd, B., C. Ford, C. Koepke Michael, K. Gary, E. Horn, S. McAnelley, and C. McAnelley 2003 :** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. GlycoScience et Nutrition, 4(6): p. 7.

[51]. **Kohen, R. and A. Nyska, 2002:** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods of their quantification. Toxicol Pathol, 30 (6): 620-50.

[52]. **Madhavi, D., S. Deshpande, and D.K. Salunkhe, 1995:** Food antioxidants: Technological: Toxicological and health perspectives. CRC Press.

[53] **Caillet, S. and M. Lacroix, 2007 :** Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire, RESALA Université de Laval, Québec, Canada.

[54] **Hossain, M.A., M. Kabir, S. Salehuddin, S.M. Rahman, A. Das, S.K. Singha, M.K. Alam, and A. Rahman, 2010:** Antibacterial properties of essential oils and methanol extracts of sweet basil *Ocimum basilicum* occurring in Bangladesh. Pharmaceutical biology, 2010. 48(5): p. 504-511.

[55]. **Hussain, A.I. 2009:** Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae. Thèse de Doctorat, University of Agriculture, Faisalabad.

[56]**Cowan. M.M, 1999:** Plants Product as Antimicrobial Agents. Clinicat Microbiology.

[57] **Baser, K.H.C. and G. Buchbauer, 2010:** Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, ISBN-10, 1420063154

[58] **Regnault-Roger C, philogene B.J.R et Vincent C ,2002 :** Bio pesticides d'origine végétale. Ed. TEC et DOC. Paris. France.

[59] **Quezel, P. and S. Santa, 1962 :** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, C.N.R.S, Editor. p. 565.

[60] **Is man M.B., 2000:** Plant essential Oils for pest and disease management, Corp. protection .N°19, pp :603-608.

[61] **Fadi Z (2011) :** Le romarin *rosmarinus officinalis* le bon procédé d'extraction pour un effet thérapeutique optimal. Thèse du doctorat en pharmacie. Université Mohammed V-RABAT.

[62] **Deyson G ;1978 :** Cours de botanique générale. 4^e série .Tome II, Organisation et classification des plantes vasculaires, deuxième partie .pp :380-381.

[63] **Boullard B ; 2001 :** plantes médicinales du monde .Réalités et croyances. Estem éditions 636P.

[64] **Bruneton J ; 1987 :** Elément de photochimie et de pharmacognosie. Paris, Technique et documents. Ed. Lavoisier. Pp : 228-584.

[65] **Wichtl M. et Anton R ; 2003 :** plantes thérapeutiques. Tradition pratique officinale. Science et Thérapeutique Technique et documents. 201p.

[66] **Bosse J ; 2005 :** Larousse des arbres, dictionnaire des arbres et des arbustes .Ed. Larousse 171p.

[67] **Bruneton J ; 2002 :** pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^e édition .PP :526. Campbell A. et Sinha R.N ;1978. Bioenergetique of graminivorous beetles, *Cryptolestes ferrugineus* and *Ryzoperthadominica* (Coleoptera :Curculionidae and Bostrychidae). Canadian Journal of Zoology, Vol.56 :624-663.

[68] **Gao, Z., Huang, K., Yang, X., Xu, H. 1999:** Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoid extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Biochem. Biophys. Acta., 1472: 643-650.

[69] **Cronquist A, 1981:** An integrated system of classification of flowering plants. Columbia univ . Press.New York.1262 P.

[70]**Carnesecchi, S., Schneider, Y., Ceraline, J., Duranton, B., Gosse, F., Seiler, N. Raul, F., 2001 :** Geraniol, a Component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. J. Phamacol. Exp. Ther. 298 (1): 197-200.

[71] **Durvelle, J.P., 1893 :** Fabrication des essences et des parfums : Extraction des essences et des parfums par distillation, par expression et par les dissolvants. J. Fritsch, Paris.

[72] **Durvelle, J.P., 1930 :** Fabrication des essences et des parfums : Chimie des parfums. Des forges, Girardot et Cie, Paris.

[73]**Charabot, E., Dupont, J., Pillet, L., 1899 :** Les huiles essentielles et leurs principaux constituants. Ch. Beranger, Paris

[74]. **Pariante, L. 2001:**Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique, A.N.d. Pharmacie, Editor. Paris. p. 1643.

[75]. **Iserin, P .2001 :** Encyclopédie des plantes médicinales, in Encyclopédie des plantes médicinales, L. Londres, Editor. p. 116, 225-226

[76] **Barla, A., G. Topcu, S. Oksuz, G. Tumen, and D. Kingston, (2007):** Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. Food Chemistry, 104(4): p. 1478-1484.

[77] **Demir, V., T. Gunhan, A.K. Yagcioglu, and A. Degirmencioglu. 2004:** Mathematical Modelling and the Determination of Some Quality Parameters of Air-dried Bay Leaves. Biosystems Engineering, **88**(3): p. 325-335.

[78]. **Quezel, P. and S. Santa, 1962 :** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, C.N.R.S, Editor. p. 565.

[79]. **Kivcak B., Mert T., 2002:** Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* L. leaf extracts. Fitoterapia. **73**: 242-243.

[80]. **Fiorini C., David B., Fouraste I., Vercauteren J., 1998:** Acylated kaempferol glycosides from *Laurus nobilis* leaves. Phytochemistry. 47: 821-824.

- [81] **Chaudhry and Tariq, 2006:** Bactericidal activity of black pepper, bayleaf, aniseed and coriander against oral isolates. Pak. J. Pharm., Vol.19 (3): p. 214-218.
- [82]. **Simi , M., T. Kundakovi , and N. 2003:** Kova evi , Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. Fitoterapia, 74(6): p. p613-616.
- [83]**Sayyah, M., J. Valizadeh, and M. Kamalinejad, 2002:** Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole- and maximal electroshock-induced seizures. Phytomedicine, 9(3): p. 212-6
- [84]**Gahukar , r ,t., 1996 :**Incidence économique des principaux insectes ravageurs des denrées alimentaires en Inde. INRA B.T.I.36 :35-39.
- [85]**Mohamed Chenni , 2016 :** «étude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles du basilic "*Ocimum basilicum* " L'extrait par hydrodistillation et par micro-ondes »Mémoire de doctorat, université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella , Oran.
- [86]**Lepesme P ,1944 :** Les coléoptères des denrées alimentaires et des produits industriels Entreposés. Ed .p lechevalier,P33.
- [87]**Camara A.,2009 :** lutte contre *Sinophilus oryzae* L. (coléoptère curculionidé) Et *Tribolium castaneum* harbst (coléoptère : ténébrionidé) dans les stocks de riz par la technique d'étuvage traditionnelle pratiquée en basse – guinée et l'utilisation des huiles essentielles végétales Thèse, doctorat, U.N.I.V.Québec. Montréal. 154p.
- [88]**Smith EH ,et whitman R .C ,1992:**«Field Guide to structural Pest ,National Pest Management Association,DunnLoring ,VA » , Newyork,pp,56-62.
- [89]**Tripathiak, prajapati v, aggarwalkk, kumar s .2001:**« Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1.8-cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera :Tenebrionidae), journal of Economic Entomology » N°94 ,PP,979-983.
- [90]**Lepesme P ,1944 :** Les coléoptères des denrées alimentaires et des produits industriels Entreposés. Ed .p lechevalier, P33.
- [91]**Scotti, G ,1978 :**« les insectes et les acariens des céréales stockées »Ed, code AFNORI, T.F.C, 238p.

[92]Balachowsky et Mensil., 1936 : Les insectes nuisibles aux plantes cultivées, leurs mesurés et leurs destructions Ed, établissement Bassam Tome 2 ; paris pp 1722-1724.

[93]Alexe Delobel et Maurices Traris 1, 1993 : les coléoptères des données alimentaires composés dans la région chaudes Ed. Darne Marginale, Paris, pp 275-279.

[94]Amellal, 1980 : Etude sur la valeur insecticide de quelque produits dans la lutte contre, Tribolium castaneum (Herbest) ,ravageur des données alimentaires stedeés Thes ing INA EL Harrache, 120 p.

[95]Faroni et Garcia- Marie, 1992 : Incendia de la température sobre los paramétrons Biologico de Tribolium castaneum, España, 18.pp :321-329.

[96]Alexe Delobel et Maurices Traris 1, 1993 : les coléoptères des données alimentaires composés dans la région chaudes Ed. Darne Marginale, Paris, pp 275-279.

[97]Bonneton F., 2008: the beetle by name of tribolium typology and etymology of Tribolium castaneum(Herbst), introduction Biochem MolBiol ; 38 :377-9.

[98]Aziez M ;Hammadouche O.,Mallem S ; Tacherifet S ,2003 : le guide pratique de l'agréeur(céréale et légumineuse alimentaire), Ed.C.N.M.A.Algérie,55p.

[99]Gwinner J ; Harnisch R. et Muck O. ; 1996 : Manuel sur la manutention et la conservation des graines après récolte Ed, R.F.A., Eichhorn, 368p.

[100]Aziez M ;Hammadouche O.,Mallem S ; Tacherifet S ,2003 : le guide pratique de l'agréeur(céréale et légumineuse alimentaire), Ed.C.N.M.A.Algérie,55p.

[101]Gwinner J ; Harnisch R. et Muck O. ; 1996 : Manuel sur la manutention et la conservation des graines après récolte Ed, R.F.A., Eichhorn, 368p.

[102]Sharma ,D,R,et Kalra,R,I , 1998 :phosphine la résistance au cours des differents drags de developpement de Trogedems (Everts). Annals of protection plant science ,6,198,200.

[103] Blanc, N.D.G.1995 : I nsectes ; acarions et insecticides dans les écosystèmes de céréales stockées, Pages 123-168. Dans : Stocké écosystème . M.dekker (Ed),New York , USA.

[104] **Zettler, J.L. et Cuperus, G, W, 1990** : Pesticides résistance à *Tribolium castaneum* (coleoptera Tenebrionidae) et *Rhyzopertha dominica* (Cleopetera :Bostrichidae) dans le blé .J.Econ.Google Translate Bznes uchun Google kit du traducteur Gadget Traduction Outil d'aide à l'export désactiver la traduction instananée A propos de Google Traduction Mobile Communauté Confidentialité et conditions d'utilisation Aide Envoyer des commentaires.

[105] **Ngassoum M , B , Ngamo T.L.S ,,Maponmetsem P.M, Jirovertz L .et Buchbauer G.2003** :Investigation of medicinal aromatic plants from Cameroon : GC/ FID,GC/MS and olfactoic analyses of essential oils *Ocimum suave* Willd.(Lamiaceae). *Acta Pharmaceutica Turcica* , 45: 69-75.

[106]**Ngamo T.L.S, Ngassoum M.B, Mapongmetsem P.M, Noudjou W.F, Malaisse F , Haubruge E,Lognay G, Kouninki H. et Hance T.2007**: use of essential oil of aromatic plants as protectant of grains during storage. *Agricultural Journal*, 2 (2): 204-209.

[107]**Kounink H,Hance T.F.A.Noudjou F.A, lognay G, Malaisse F, Ngassoum M, B, Mapongmetsem P,M.T,L,S et Haubrug E.2007**: ,of,some terpenoids of essential oils of *Xylopi aethiopica* from Cameroon against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *journal of Applied Entomology*.

[108]**Noudjou F, kouniki H, Hance T, Haubruge E, Ngamo T.L.S, Maponmestsem P,M,, Ngassoum M,B, M,, Ngassoum M,B, Malaisse F, Marlier M. et Lognay G. 2007**: Composition of *Xylopi aethiopica* (Dunal) A . Rich essential oils from Cameroon and identification of a minor diterpene : ent- 13 –epi manoly oxide. *Biotechnology Agronomic Society Environment* , 11(3): 193-199.

[109]**Goudoum A.2010**: Impact des huiles essentielles sur le potential technologique et nutritionnel des grains et farine de maïs au cours du stockage.Thèse de Doctorat , ENSAI, Université de Ngaoundéré, Cameroun , 180p.

[110]**Regnault- Roger C, 2002** : De nouveaux phyto-insecticides pour le troisémie In Philogène B,J,R , Regnault- Roger C, & Vincent C , courd Biopesticides d'origine végétale :Lavoisier-Editions Tec & Doc , 19-39.

[111] **Benayad N , 2008** : les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : noyen efficace de lutte contr les ravageurs des dearées alimentaires stockeés.

[112]**Kaid Slimane I. L., 2004:** Contribution à l'étude de la composition chimique et Du Pouvoir antibactérien des huiles essentielles de *Cistus ladaniferus* de la région de Tlemcen, Mémoire ing. D'état en Biologie, Option : Contrôle de Qualité et Analyse.Univ. Tlemcen, pp:23-25.

[113]**Rahmani Mouna et Belhathat Massouda, 2014 :** Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des huiles issues de plantes médicinales (thym, Eucalyptus, Morjolaine) mémoire de master, université khemis Miliana ,khemis Miliana.

[114]**British Pharmacopée, (2004):**4^{ème} édition.

[115] **Tome 2 ed. 2000 :** Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse Monographies relatives aux huiles essentielles.

[116]**Pharmacopée Européenne, (2001) :**8^{ème} édition, Service Européen de la Qualité du Médicament-Conseil de L'Europe.

[117]**The United States Pharmacopial Convention,(2001):**9^{ème}édition,Inc.USP24-NE19.

[118]**Afnor,2000 :** huile essentielles Echantillonnage et méthode d'analyse monographie relative aux huiles essentielles (Ton 2).

[119].**Liang, N. and D.D. Kitts, 2014:** Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*. **19**(11): p. 19180-19208

[120]**Burits,M. ;Bucar,F.PhytotherapyReserch,2000:**14(5),323-328 ;b)Ozcelic, B. ;Lee,J.H. ;Min,D.B.journal of Food science 2003,68(2),487-490.,

[121]**Sharififar, F. ;Moshafi M.H. ; Mansouri , S.H. ; Khodashenas, M. Food Control 2007;**18,800-805.

[122]**Sanchez\$-Moreno, C.; Larraurijose, A.1998:** Saura-Calixto, F.Journal of the Science of Food and Agriculture, 76 (2), 270-276.

[123]**Burits M., & Bucar F. (2000):** Antioxydant Activité Of *Nigella Sativa* Essential Oil .Phytothérapie Research, 14, 323-328.

[124] **Oile M , (2002) :** Direction de la concurrence de la consommation et de répression des fraudes interrégionales de Montpellier. Dossier P 3325 Technique d'analyse Vol papier n TA.

[125] **Cherrat, L., L. Espina, M. Bakkali, D. García Gonzalo, R. Pagán, and A. Laglaoui,2014:** *Chemical composition and antioxidant properties of Laurus nobilis L. and Myrtus communis L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation.* Journal of the science of food and agriculture, 2014. **94**(6): p. 1197-1204.

[126] **Marzouki, H., A. Piras, K.B.H. Salah, H. Medini, T. Pivetta, S. Bouzid, B. Marongiu, and D, 2009:** Falconieri, *Essential oil composition and variability of Laurus nobilis L. growing in Tunisia, comparison and chemometric investigation of different plant organs.* Natural Product Research, 2009. **23**(4): p. 343-354.

[127] **Sellami, I.H., W.A. Wannes, I. Bettaieb, S. Berrima, T. Chahed, B. Marzouk, and F, 2011:** Limam, *Qualitative and quantitative changes in the essential oil of Laurus nobilis L. leaves as affected by different drying methods.* Food Chemistry, 2011. **126**(2): p. 691.

[128] **Ibrahim, M.E. and S.A. El-Sawi,2007:** *Biochemical studies on the volatile oils of Laurus nobilis L. plants grown in Egypt.* Planta Med. **73**(09): p. P_611.

[129] **Sangun, M.K., E. Aydin, M. Timur, H. Karadeniz, M. Caliskan, and A, 2007:** Ozkan, *Comparison of chemical composition of the essential oil of Laurus nobilis L. leaves and fruits from different regions of Hatay, Turkey.* Journal of Environmental Biology. **28**(4): p. 731-733.

[130] **Basak, S.S. and F. Candan,2013:** *Effect of Laurus nobilis L. Essential Oil and its Main Components on α -glucosidase and Reactive Oxygen Species Scavenging Activity.* Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. **12**(2): p. 367.

[131] **Moghtader, M. and A. Farahm,2013:** *Evaluation of the antibacterial effects of essential oil from the leaves of Laurus nobilis L. in Kerman Province.* Journal of Microbiology and Antimicrobials, 2013. **5**(2): p. 13-17.

[132] **Flamini, G., M. Tebano, P.L. Cioni, L. Ceccarini, A.S. Ricci,2007:** and I. Longo, *Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of Laurus nobilis L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven.* Journal of Chromatography A. **1143**(1-2): p. 36-40.

- [133] Di Leo Lira, P., D. Retta, E. Tkacik, J. Ringuelet, J.D. Coussio, C. van Baren, and A.L. Bandoni, 2009: *Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (Laurus nobilis L.) from Argentina*. *Industrial Crops and Products*. **30**(2): p. 259-264.
- [134] Stanberry, L. R., Bernstein, D. I., Myers, M. G., 1986: *Antiviral Research*. **6**(2): 95-102.
- [135] Asen, S., Stewart, R. N., Norris, K. H., 1975. *Phytochemistry*, **14** (5-6): 1443-1444.
- [136] Ozenda, P., Hunbert, H., 1958. *La flore du Sahara Septentrional et Cenral*, 437-438.
- [137] Lee, J. R., Yang. M. S, Jang. D. S., Ha, T. J., Park, K. M., Lee, C. H., Kho, Y. H., Park, K. H., 2001: *Planta Medica*, **67**(6): 585-587.
- [138] Shin, K. H., Kang, S.S., Seo, E. A, Shin, S.W., 1995: *Arch. of Pharm. Res.*, **18** (2): 65-8.
- [139] Simi, M., T. Kundakovi, and N. Kova evi, 2003: *Preliminary assay on the antioxidative activity of Laurus nobilis extracts*. *Fitoterapia*, **74**(6): p. 613-616.
- [140] Aliaga, C., Lissi A. E. 2004. *Can. J. Chem.* **82**: 1668-1673.
- [141] Moreira, M.R., A.G. Ponce, C.E. Del Valle, and S.I, 2005: *Roura, Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen*. *LWT - Food Science and Technology*. **38**(5): p. 565-570.
- [142] Ponce, A., R. Fritz, C. Del Valle, and S, 2003: *Roura, Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard*. *LWT-Food Science and Technology*, **36**(7): p. 679-684.