

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET  
POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
Ecole Nationale Polytechnique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT DE GENIE CHIMIQUE

PROJET DE FIN D'ETUDES

**EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES DU  
ROMARIN ET DU THYM.  
COMPORTEMENT INSECTICIDE DE CES DEUX  
HUILES SUR *Rhyzopertha Dominica* (Fabricius)  
(*Coleoptera-Bostrychidae*)**

Proposé et dirigé par :  
Mlle. C. BOUTEKEDJIRET  
Mme W. KHALFI

Etudié par :  
Mlle. R. EL-GUEDOUI

Promotion : Juin 2003



# *DEDICACES*



*A mes grands-parents*

*A mes parents*

*A ma sœur Samira*

*A mon frère Nassim*

*A mes amis*

## **Remerciements**

*Je remercie dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mademoiselle C.BOUTEKEDJIRET, maître de conférence à L'E.N.P, pour m'avoir confié ce sujet; mais aussi pour l'aide précieuse, l'intérêt et le suivi réguliers, sans lesquels ce travail n'aurait pas pu aboutir.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements et toute ma gratitude à madame W.KHALFI, chargé de cours à l'I.N.A, qui a suivi avec un grand soin l'ensemble de ce travail.*

*A madame S.CHARCHARI, maître de conférence à l'E.N.P j'exprime ma sincère reconnaissance pour l'honneur qu'elle m'a fait de présider le jury de la soutenance.*

*Que Madame R.DERRICHE, maître de conférences à l'E.N.P  
Monsieur E. H. BENYOUSSEF, maître de conférences à l'E.N.P*

*Trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de ce jury.*

*Tous mes remerciements s'adressent également à mademoiselle YAHIAOUI Nabila, chef de projet de développement des huiles essentielles au groupe SAIDAL*

*Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à monsieur BICHE, enseignant à l'I.N.A. Et aussi à exprimer mon éternel reconnaissance et ma profonde gratitude à mes parents pour les sacrifices, la compréhension et le soutien sans failles qu'ils m'apportent depuis toujours*

*Je remercie également ma sœur Samira, mon frère Nassim, mes amis Taouinet Yacine, Bouakaz Leila, Ferradji Fariza, Fezoua Amara, Belkadi Abdelkrim, Gridi Faiza et tous les agents et les bibliothécaires et Radia la technicienne pour leur aide précieuse.*

*Enfin, ne pouvant citer toutes celles et ceux qui m'ont été d'un apport petit ou grand, je leur adresse mes remerciements les plus sincères.*

تعلق هذه الدراسة باستخلاص الزيوت الأساسية لنبتي الإكليل و الزعتر ببخار الماء و بالتقطير المائي، و تقييم مدى سمو ميتها على حشرة محربة للزرع.

المردود المتحصل عليه لكل من النباتين يتماشى مع القيم المعتادة. بينت الدراسة الحركية لاستخلاص الزيوت الأساسية لكل من النباتين ببخار الماء أنها تمر بمرحلتين أو لهما ثابت و الثانية بطيئة متناقصة، اما بتقطير المائي، فهناك مرحلة واحدة متناقصة. كما سمحت التحاليل بتعرف على مكونات كل من الزيتين؛ 67 مركب لزيت الإكليل و 24 مركب لزيت الزعتر.

أما تجارب سمومية هذه الزيوت الأساسية، بينت فعاليتها بالاتصال و الشم على ريزوبارتا دومينكا الذي يمثل خطر على المحاصيل الزراعية. كما أن هذه الفعالية تزداد بزيادة كمية الزيت. كما أننا تمكنا للوصول إلى أن هذه الزيوت تنفر هذه الحشرة، تنقص فعاليتها مع الوقت.

## ABSTRACT

This work concerns the extraction of oils essential of thyme and rosemary by drive with the water vapor and hydrodistillation and evaluation of their toxicity on a cereal ravageur.

The outputs obtained for the two plants are in conformity with the data of the literature. Study of the kinetics of extraction by drive with the vapor showed that this one was done in two stages, a first rapid at constant speed and a slower second at decreasing speed. Whereas for hydrodistillation, the variation speed extraction shows existence only period at decreasing speed. Analyze of two oils per drive with the water vapor allowed identify 67 components for rosemary, whereas that of thyme allowed identify 24 components.

The results of test toxicity show that oil essential rosemary and of thyme have insecticidal properties by contact and inhalation on *Rhyzopertha Dominica*. The toxicity of these two oils increases with the amount used, however these two oils also present repulsive properties on insect tested and their action duration is limited in time.

## RESUME

Ce travail porte sur l'extraction des huiles essentielles de thym et de romarin par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation et l'évaluation de leur toxicité sur un ravageur de céréales.

Les rendements obtenus pour les deux plantes sont conformes aux données de la littérature. L'étude de la cinétique d'extraction par entraînement à la vapeur a montré que celle-ci se faisait en deux étapes, une première rapide à vitesse constante et une seconde plus lente à vitesse décroissante. Alors que pour l'hydrodistillation, la variation de la vitesse d'extraction montre l'existence d'une seule période à vitesse décroissante. L'analyse des deux huiles par entraînement à la vapeur d'eau a permis d'identifier 67 constituants pour le romarin, alors que celle du thym a permis d'identifier 24 constituants.

Les résultats des testes de toxicité montrent que l'huile essentielle de romarin et de thym possèdent des propriétés insecticides par contact et par inhalation sur *Rhyzopertha Dominica*. La toxicité de ces deux huiles augmente avec la dose utilisée, cependant ces deux huiles présentent également des propriétés répulsives sur l'insecte testé et leur durée d'action est limitée dans le temps.

**Mots clefs :**

*Rosmarinus officinalis*. L; *Thymus fantanesii* ; *Rhyzopertha Dominica* ; entraînement à la vapeur d'eau; Hydrodistillation; toxicité; rémanence; répulsivité.



# SOMMAIRE

Pages

## RESUMES

## SOMMAIRE

## INTRODUCTION GENERALE

1

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE I : MATIERES VEGETALES : «le romarin et le thym»

I. Le romarin.	
I.1. Description botanique.	2
I.2. Utilisation du Romarin.	
I.3. Travaux antérieurs.	6
II. Le thym.	
II.1. Description botanique.	7
II.2. Variabilité du thym.	8
II.3. Utilisation du thym.	9

### CHAPITRE II : LES HUILES ESSENTIELLES

I. Définition des huiles essentielles.	11
II. Localisation des huiles essentielles.	12
III. Rendement.	12
IV. Propriétés physiques des huiles essentielles.	13
V. Composition chimique des huiles essentielles.	14
VI. Qualité des huiles essentielles.	15
VII. Facteurs de variabilité des huiles essentielles.	15
VIII. Fonctions biologiques des huiles.	16
IX. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles.	16
X. Toxicité des huiles essentielles.	17
XI. Utilisation des huiles essentielles.	17
XII. Conservation des huiles essentielles.	



XIII. Les différents modes de production des huiles essentielles.	18
XIII.1. Procédés mettant en jeu la vapeur d'eau.	18
a. Entraînement à la vapeur d'eau.	18
b. Hydrodistillation.	18
XIII.2. L'expression.	18
XIV. Méthodes d'analyse des huiles essentielles.	18
XIV.1. Chromatographie en phase gazeuse. (CPG)	19
XIV.2. La spectrométrie de masse. (SM)	19
XIV.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. (CG/SM)	22

### **CHAPITRE III : APERCU GENERAL SUR LA BIOLOGIE DU *RHYZOPERTHA DOMINICA***

I. Origine et répartition géographique.	24
II. Régime alimentaire et dégâts.	26
III. Description des différents états du cycle biologique de l'insecte.	27
IV. Le cycle de développement.	29
V. Moyens de lutte.	30

### **CHAPITRE IV : ETUDE DE LA TOXICITE**

I. Définition de la toxicité.	33
II. Caractères généraux des essais de toxicité.	33
III. La dose efficace moyenne.	36
IV. Estimation de la DL50.	37
V. Les droites de régression	37

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **CHAPITRE V : EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DU ROMARIN ET DU THYM**

I. Entraînement à la vapeur d'eau.	39
II. L'hydrodistillation.	40
III. Matériels et méthodes.	40
III.1. Entraînement à la vapeur d'eau.	40
III.2 Hydrodistillation.	40
IV. Conditions opératoires.	42

V. Calcul du rendement.	43
VI. Résultats et discussion.	
VI.1. Rendement en huile essentielle.	43
VI.2. Etude de la cinétique d'extraction.	44
VI.3. Propriétés organoleptiques et physiques.	48
VI.4. Composition chimique des huiles essentielles.	
VI.4.1. Composition chimique de l'huile essentielle de romarin.	49
VI.4.2. Composition chimique de l'huile essentielle de thym.	52

## **CHAPITRE VI : EVALUATION DE LA TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES SUR *RHYZOPERTHA DOMINICA***

I. Matériels et méthodes.	56
I.1. Matériel entomologique.	56
I.2. Huiles essentielles.	56
II. Méthodologie.	57
II.1. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles par contact.	57
II.2. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles par inhalation.	57
II.3. Evaluation de la persistance d'action des deux huiles essentielles.	57
II.4. Evaluation de l'activité répulsive des huiles essentielles.	58
II.5. Evaluation de la combinaison des deux huiles testées.	58
III. Résultats et interprétation.	
III.1. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles par contact.	59
III.2. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles par inhalation.	62
III.3. Evaluation de la persistance d'action des huiles essentielles testées.	65
III.4. Evaluation de l'activité répulsive des huiles essentielles.	66
III.5. Evaluation de la combinaison des deux huiles essentielles.	68

**CONCLUSION GENERALE** 70

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 73

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

# INTRODUCTION GENERALE

# INTRODUCTION GENERALE

Les plantes ont toujours fait partie de la vie de l'homme puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois même dans ses rites religieux. Les extraits de plante étaient déjà connus et utilisés par les égyptiens, les perses et les grecs pour leur propriété aromatisantes et médicinales [1].

L'Algérie recèle un patrimoine végétal très riche, mais par manque d'informations sur les richesses qu'il peut probablement engendrer, celui ci est malheureusement très peu exploité. Parmi les plantes aromatiques et médicinales spontanées, notre intérêt s'est porté sur le romarin (*Rosmarinus Officinalis*.L) et le Thym (*Thymus fontanesii*) faisant l'objet de plusieurs recherches dans le monde.

Les huiles essentielles de ces deux plantes possèdent des propriétés insecticides. Leur action toxique par fumigation et par contact de même que leur effet anti-appétant et répulsif ont été à maintes reprises prouvés dans le monde [2-4]. Paradoxalement des travaux relatifs au romarin et au thym algérien sont très rares.

Dans le but de minimiser l'utilisation des insecticides de synthèse dans les stocks algériens, nous nous proposons de déterminer l'activité insecticide de l'huile essentielle de romarin et de thym.

Le travail que nous avons entrepris comporte deux parties :

- La première partie est consacrée à l'extraction de l'huile essentielle de romarin et de thym par entraînement à la vapeur et par hydrodistillation et à la comparaison de leur cinétique d'extraction.
- La seconde partie traitera l'évaluation du caractère insecticide de ces huiles essentielles. Dans un premier temps des essais seront menés pour confirmer les résultats obtenus lors d'un précédent travail [5]. Par la suite nous étudierons la rémanence des huiles essentielles testés, leur répulsivité et l'effet de leur association sur l'insecte choisi.

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# **CHAPITRE I**

## **MATIERES VEGETALES : «LE ROMARIN ET LE THYM»**

# I

## MATIERES VEGETALES : «LE ROMARIN ET LE THYM»

### I. Le romarin.

#### I.1. Description botanique.

Le romarin "*Rosmarinus officinalis* linné" (figure1) est un arbrisseau très odorant qui pousse à l'état sauvage ou cultivé. C'est une plante aromatique, médicinale, condimentaire et spontanée caractéristique du bassin méditerranéen, et sans doute l'une des plantes les plus populaire en Algérie. Il recouvre plus de 70000 ha du territoire national [6].

Le romarin appartient à la deuxième série de la famille des labiées qui en compte six. Cette famille, l'une des plus importantes de la flore d'Algérie, compte plus de 200 genres et 3500 espèces [7-9]. La classification complète du genre *Rosmarinus* n'a été achevée qu'au début de ce siècle. Trois espèces ont été d'écrites : *Rosmarinus officinalis* L, objet de notre étude, *Rosmarinus eriocalyx* et *Rosmarinus tomentosus* [10,11].

L'appellation *Rosmarinus*, qui signifie rosée de la mer, pourrait s'appliquer au parfum de la plante, à la couleur de sa fleur ou même à sa prédilection pour le littoral. *Officinalis* rappelle les propriétés médicinales de la plante [12].

Le romarin est considéré comme un arbuste aromatique à feuilles nombreuses, dures, étroites, linéaires et mesurant jusqu'à 3 cm de long, riche en huile essentielle. Elles sont gaufrées, verdâtres au dessus, plus ou moins hispides et blanchâtres en dessous, et présentent une marge révoluée. Ses fleurs, longues de 1 à 3 cm, sont disposées en épis courts et serrés partant de l'aisselle des feuilles. Elles présentent un calice en cloche, bilabié à corolle tubuleuse de 2 cm de long, de couleur bleu – mauve [7,9,14,15].

Il est vrai que bien arrosé et cultivé, il peut atteindre 2 mètres de hauteur; mais il faut de loin préférer cette même plante lorsqu'elle pousse dans les rocailles

ensoleillées, elle n'y dépasse pas les 50 cm de haut et son parfum est alors excessivement puissant et corsé [16].

Le Romarin n'est pas rustique dans les régions aux hivers froids et rigoureux, il prospère en plein soleil, dans les sols au pH entre 6 et 7,5. Il vaut mieux le cultiver dans un sol aride et pauvre plutôt dans un sol fertile et humide, cela donne des plantes plus compactes et odorantes [16].

Le tableau I donne les principales localisations géographiques du romarin en Algérie [6].



**Figure 1** : Le romarin : *Rosmarinus officinalis* L



**Tableau I** : Principales localisations géographiques du romarin en Algérie [6]

Wilaya	Nom local	Partie utilisée	Utilisation en médecine traditionnelle	Mode d'emploi	Superficie approximative
Biskra	K'lil	Toute partie aérienne	Rhumatisme - douleurs stomacales - défaillance de foie	Tisane	1500 ha
Khenchela	K'lil	Feuilles	Maladies du cœur - estomac - jaunisse	Infusion	5000 ha
Bouira	M'zir	Feuilles	Douleurs stomacales - Plante fourragère	Infusion	
Ain - Timouchent	Halhal	Toute partie aérienne	Asthénie - cellulite - frigidité - migraine - œdème - surmenage - dépression nerveuse - entorse - foie - impuissance	Infusion Inhalation Massage	800 ha
Nâama	Yazir el Bel	Rameau x Et fleurs	Antispasmodique et antiseptique	Infusion et bain	500 ha
El-bayadh	Azir Halhal	Feuilles	Insomnie - fonction biliaire - troubles intestinaux - tonique pour le foie	Tisane	
Mila		Feuilles	Antispasmodique et antiseptique - Plante fourragère - mélangée au bain contre la peau sensible.	Infusion	4000 ha
Mascara	Halhal	Feuilles	Antispasmodique - carminatif - stomachique - - emménagogue - cosmétique (parfums)	Extrait sec et liquide - infusion - collyres.	1500 ha
			Douleurs rhumatismales - circulation du sang -	Infusion	

Médéa	Yazir	Feuilles	excitation de digestion -relève le tonus des surmenés et des convalescents - stimulation de la fonction biliaire - effet tonifiant sur le foie - inflammation de la fonction biliaire - paresse d'estomac	Essence Teinture Sirop Extrait sec Extrait liquide Collyres	
M'sila		Feuilles	Toux - conjonctivite - graines consommées par les ovins	Infusion Collyres	45000 ha
Sétif	El' klil	Feuilles fleurs	Douleurs gastriques et coliques - Condimentaires	Infusion	3500 ha
Souk ahras		Feuilles	Estomac - cuir chevelu	Infusion	4410 ha
Bédjaia					500 ha
Sidi Belabes			Estomac - grippe		429,5 ha
Oran		Feuilles	Antispasmodique antirhumatismale	Infusion	2570 ha
Mostaganem		Feuilles	Rhumatisme		400 ha

## I.2. Utilisation du Romarin.

Depuis très longtemps, le romarin est utilisé à des fins très diverses. Il est cultivé comme plante condimentaire et ornementale. Ses feuilles riches en huile essentielle; à la saveur un peu amère, dégagent une odeur qui rappelle l'encens et le camphre. Il éloigne les mites et papillons autant au jardin que dans la lingerie. Il fleurit de septembre à mai, selon les climats, période pendant laquelle les fabricants de miel exploitent ses fleurs, tandis que les parfumeurs préfèrent le cueillir de mai à juillet [17-19].

En cuisine, il est utilisé comme aromate; sa forte teneur en bornéol lui confère de puissantes propriétés antiseptiques qui font de lui un bactéricide de choix en conserverie. Butiné par les abeilles, il donne au miel sa saveur agréable et forte.

L'huile essentielle de romarin est très utilisée en cosmétologie (savons, parfums, crèmes, etc.), mais aussi dans l'industrie alimentaire pour leur pouvoir aromatique et aussi leur action régénérante et hydratante.

Cette plante est également employée dans de nombreuses préparations médicinales en raison de ses propriétés aromatiques, stimulantes, antispasmodiques, antiseptiques, antirhumatismales, cicatrisantes, détoxiquantes, diurétiques, toniques, cardiaques et stimulantes.

La production mondiale des essences de romarin a atteint 150 tonnes en 1984. L'Espagne en a produit 130 tonnes, le Maroc 65 tonnes et la Tunisie 55 tonnes. La consommation mondiale annuelle est estimée entre 400 et 500 tonnes [18].

### **1.3. Travaux antérieurs.**

Le romarin, plante aromatique et médicinale méditerranéenne, est connu et utilisé depuis l'Antiquité. Il a été cité par des savants arabes du Moyen Age qui l'utilisent en médecine classique [17]. Cependant, il y a à peine un demi-siècle, avec l'avènement des méthodes d'analyses, que l'identification des extraits de romarin a commencé et a fait l'objet de plusieurs études.

En 1989, Fournier et Coll. [21] montrèrent que le romarin de Tunisie contenait plus de 50% de 1,8-cinèole.

En 1992, Flamini et Cion [22] étudièrent la variation de la composition de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* en fonction de la période de cueillette et de la coloration de la fleur. Ils constatèrent que l'huile extraite du romarin à fleurs blanches contenait plus d'hydrocarbures et de 1,8-cinèole que celle de romarin à fleurs bleues et cela au détriment des alcools monoterpéniques et de leurs esters, tandis que les rendements en huile semblaient plus élevés au mois de septembre qu'au mois de mars.

Svoboda et Deans [23] étudièrent les propriétés antioxydantes de l'huile essentielle commerciale de romarin anglais et aboutirent à de bons résultats.

En 1997, Arnold et Coll. [24] publièrent les résultats relatifs à une étude comparative des huiles essentielles de *Rosmarinus eriocalyx* Jordan et Fourr d'Algérie et de *Rosmarinus officinalis* d'Espagne et d'Italie. Ils constatèrent que les mêmes composés se retrouvaient dans ces huiles mais à des teneurs différentes.

En 1999, Musa Özcan [25] a montré que les extraits du chloroforme et du méthanol du romarin présentent une grande activité antioxydante sur l'huile d'olive et l'huile de sésame.

En 2001, D.P.Papachristos et D.P.Stamopoulous [26] ont testé la toxicité de l'huile essentielle de romarin sur l'*acanthoscelides*. Ces testes ont révélé que cette

huile essentielle a une action répugnante, réduit la fécondité et l'éclosion de l'œuf, augmente la mortalité des larves et influence défavorablement l'émergence de la progéniture. Cet empoisonnement est plus fréquent chez les femelles.

Les recherches actuelles visent à mettre en œuvre des procédés adéquats permettant la sélection de substances naturelles antioxydantes capables de remplacer les produits artificiels utilisés dans l'industrie alimentaire.

A travers cette revue bibliographique nous constatons que l'huile essentielle de romarin a été très étudiée. Toute fois les travaux concernant l'huile essentielle de romarin d'Algérie sont moins nombreux [5,24,27,28].

## II. Le thym.

### II.1. Description botanique.

Le thym (*Thymus*) est une petite plante aromatique ne dépassant pas 30 cm, à la tige très ramifiée, ligneuse et aux branches duveteuses et grisâtres. Ses feuilles ont des formes variées, linéaire à elliptico-lancéolée ou rhomboïdale, à bord replié et à surface velue [17].

Ses fleures, réunies en épis au sommet des branches, ont un calice tubuleux se terminant par 2 lobes. Le lobe supérieur étant lui-même divisé en 3 dents et le lobe inférieur en 2 dents allongées, et une corolle également tubuleuse et bilabée dont la lèvre supérieure est entière et la lèvre inférieure découpée en 3 petits lobes. Le fruit est formé de 4 akènes marrons et presque ronds [17].

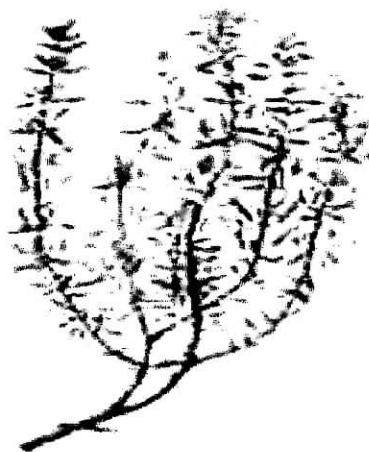
*Thymus fontanesii* (Figure 2), objet de notre étude, "zaâteur" en arabe, est aussi appelé "thym vrai", présente un calice à cinq dents toutes longuement subulées, bien plus longues que le tube, a lèvre supérieure divisée dans son tiers supérieur. Les tiges sont dressées et robustes. Ses feuilles sont oblongues et lancéolées entières et glabres rarement hispides. Les inflorescences sont plus ou moins interrompues vers le bas. Les fleurs du *Thymus fontanesii* sont blanches ou pâles à peines plus longues que le calice. On trouve cette espèce de thym dans les garrigues et pelouses [29].

Le thym est un arbrisseau sauvage originaire de la Méditerranée, il pousse sur les montagnes arides (1500 m), en Algérie, au Maroc, au Sud de la France et dans les provinces de l'Espagne [15].

Le nom thym vient du mot grec « *thymos* » qui veut dire odeur, et à ce titre, le thym est très largement utilisé en qualité de plante aromatique, en particulier dans la cuisine méditerranéenne en tant que condiment [30].

Le thym est renommé pour ses vertus médicinales, il est recommandé en infusion contre les refroidissements de toutes sortes, les rhumes, les rhumatismes et douleurs articulaires [31].

Le thym est très résistant. Il a besoin de soleil et pousse à l'état sauvage sur les collines arides des régions méditerranéennes. La germination prend deux ans, aussi il est préférable de reproduire la plante par division de racines, par marcottage ou par bouturage. A chaque printemps, il est préférable d'engraisser la terre avec de l'engrais ou de la poudre d'os et de couper la plante de moitié pour favoriser l'apparition de nouvelles pousses. Par contre, il ne faut pas mettre de l'engrais durant l'été car cet apport excédentaire de vitamines rend la plante fragile à l'époque des gelées. Il faut renouveler les plants tous les trois ans sinon la tige devient trop ligneuse et ses feuilles perdent leur goût si caractéristique [32].



**Figure 2 :** Le tym : *Tymus fontanasii*

## II.2. Variabilité du thym.

La botanique de la plante à partir de laquelle on distille l'huile essentielle est confuse [30]. En Espagne, principal pays producteur de cette essence, il existe tellement d'espèces et de variétés de thym sauvages, que certaines portent des noms assez originaux. La même chose est observée au Maroc et autres pays méditerranéens.

Dans le commerce, l'appellation de "l'huile de thym" est occasionnellement appliquée, de façon erronée, à l'huile distillée à partir des plantes appartenant à des espèces autres que *thymus vulgaris*.L, ou *thymus zygis*.L.

Le thym, spontané dans les endroits secs et ensoleillés dans la région méditerranéenne, forme un petit buisson serré à fleurs rosées, à forte odeur aromatique. Aromate très apprécié, le thym sert à parfumer sauces, charcuteries, poissons. Il entre également dans la composition du bouquet composé ainsi que dans la confection de la Bénédicte ou du Vinaigre des 4 voleurs. Le thym est très

désinfectant, il modifie la flore intestinale, il est apéritif et calmant dans les toux spasmodiques.

Il existe plus de quarante espèces différentes de thym, *thymus* en Latin, que l'on peut ranger en trois catégories :

- **Le thym "classique"**: ses tiges sont ligneuses, c'est-à-dire qu'elles ont la consistance et l'apparence du bois sec. Ses petites feuilles n'ont pas de pétiole (partie fine de la feuille qui relie la partie large de cette feuille à la tige) ses racines ne sont pas "adventives" (de nouvelles racines ne se forment pas à partir de branches qui pourraient traîner au sol). Hauteur de la pousse : jusqu'à 40 cm.
- **Le serpolet** : lui a des racines adventives. Il en existe plus de quinze variétés, dont une particulière nommée "thym citron" avec des petites tiges droites au bout desquelles les feuilles forment des boules rondes.
- **La sariette** : les tiges ne sont pas "ligneuses" et donc plus souples que celles du thym classique, elles se dressent plus verticalement, les feuilles sont très fines et étroites.

Selon les endroits, les personnes, les livres, ces nom peuvent changer. Mais on se sert indifféremment de l'une ou l'autre des espèces pour les nombreuses utilisations.

### II.3. Utilisation du thym.

Depuis plus de 12000 ans, le thym accompagne la vie quotidienne des humains, tant pour ses usages médicaux et cosmétiques que culinaires. Les Sumériens et les Egyptiens de la haute Antiquité l'utilisaient pour embaumer leur mort [32]. Chez les Romains, on faisait brûler du thym pour purifier l'air et éloigner les animaux nuisibles; on s'en servait aussi pour aromatiser fromages et boissons alcooliques et les militaires en mettaient dans leur bain pour se donner de la vigueur. Au Moyen-âge, le thym était réputé pour donner du courage aux chevaliers. De nos jours, l'huile essentielle de thym ou le thymol, dont elle est une riche source, sont couramment utilisés pour la confection de savons et cosmétiques divers. Plusieurs marques (produits) nord-américaines renferme du thymol (ainsi que de l'eucalyptol et du menthol). Il en va de même pour quelques dentifrices. En Europe, le thym compte encore parmi les plantes les plus fréquemment recommandées contre la toux et l'inflammation des voies respiratoires [33].

Bien que les essais cliniques au cours desquels on a testé l'efficacité du thym comme seul agent thérapeutique soient inexistant, une longue pratique clinique ininterrompue et les opinions médicales convergentes de nombreux experts respectés ont fait en sorte que certains des usages médicaux traditionnels du thym sont aujourd'hui reconnus. Plusieurs chercheurs reconnaissent son efficacité pour le traitement des symptômes de la bronchite, de la coqueluche et de l'inflammation des

voies respiratoires. En plus de ces usages, on lui reconnaît une utilité pour le traitement de la stomatite et de l'halitose. Quant à l'Organisation mondiale de la santé, elle souligne qu'en plus de ces usages, les pharmacopées européennes mentionnent le thym pour traiter la dyspepsie et d'autres troubles gastro-intestinaux, la laryngite et l'amygdalite (en gargarisme), ainsi que les blessures cutanées mineures et les inflammations ou infections des muqueuses buccales (usages topiques).

Les seules études cliniques dont on dispose pour évaluer l'efficacité du thym en matière d'hygiène buccale viennent des nombreux essais cliniques menés sur un rince-bouche populaire qui renferme de l'eucalyptol, du thymol et du menthol. L'efficacité documentée de ce produit pour combattre la plaque dentaire et les bactéries qui sont impliquées dans ce processus (et qui causent la carie et la gingivite) serait due, notamment, à l'action du thymol sur les membranes cellulaires des bactéries. En plus d'avoir une action inhibitrice sur les bactéries responsables de la carie dentaire et de la gingivite, on a constaté que ce rince-bouche populaire agissait également *in vitro* contre certains virus dont ceux de la grippe et de l'herpès [33].

Les résultats d'une étude à double insu contre placebo indiquent qu'un mélange d'huiles essentielles de romarin, de lavande, de thym et de noix de cèdre peut être utile pour les personnes souffrant de cette dermatose. Les 86 sujets atteints devaient chaque jour appliquer la lotion durant deux minutes en massant leur cuir chevelu, puis appliquer une serviette chaude pour augmenter l'absorption. Les chercheurs ont constaté une repousse de cheveux chez 44% des sujets utilisant la lotion active et chez seulement 15% de ceux utilisant la lotion placebo. Cette étude, qui a duré sept mois, comporte néanmoins des faiblesses : par exemple, la lotion utilisée comme placebo ne dégagait pas la même odeur que la lotion "active" et 32% des sujets du groupe placebo ont abandonné le traitement avant la fin de l'étude, ce qui peut biaiser les résultats[33].

# **CHAPITRE II**

## **LES HUILES ESSENTIELLES**



# II

## LES HUILES ESSENTIELLES

### I. Définition des huiles essentielles.

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes que l'on peut extraire de certaines plantes appelées pour cette raison aromatiques. Dans le langage courant on les appelle indifféremment huiles essentielles, essences de plantes, essences aromatiques ou extraits aromatiques de plantes. Les huiles essentielles sont des produits le plus souvent liquides, plus ou moins épais, ayant une odeur souvent forte et très caractéristique, en général incolores – sauf certaines variétés comme la cannelle qui est rougeâtre, la camomille qui est bleutée ou encore le bouleau de couleur noire [34].

D'après Naves [35], aucune des définitions des huiles essentielles n'a le mérite de la clarté, ni celui de la précision. Cet auteur définit les huiles essentielles comme des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale. Ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau. Cette définition est restrictive car elle ne tient pas compte des produits obtenus par expression à froid (à la température ordinaire) du péricarpe ou zest de fruit de citrus.

Quand à la norme AFNOR [36], elle définit les huiles essentielles comme étant " des produits obtenus soit à partir de matières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques ".

L'huile essentielle est l'extrait obtenu par distillation. Dans les plantes aromatiques, l'essence assure un rôle de réserve énergétiques et de système de défense. Ce sont les plantes sauvages qui poussent dans des conditions arides et sous un fort

ensoleillement qui en auront le plus besoin et qui donneront donc les huiles essentielles de meilleure qualité [34].

La définition Scientifique de l'huile essentielle, est la sécrétion de la plante contenue dans de micro – poches constituées de cellules qui vont l'élaborer.

## **II. Localisation des huiles essentielles.**

La présence des huiles essentielles chez les végétaux est due à l'acquisition d'organes sécréteurs au cours de leur évolution. Ainsi les huiles essentielles se rencontrent dans toutes les parties de la plante.

La synthèse de ces essences est liés à des cellules spécialisées, rarement isolées (feuille du laurier, gingembre...), le plus souvent regroupées en poches (rutacées, astéracées ...) ou en canaux sécréteurs (opiacées, astéracées...). L'excrétion des huiles essentielles dans la cavité des poches ou canaux est réalisée par exocytose (myrtacées) ou par lyse des cellules bordant la cavité (rutacées) [37].

## **III. Rendement. [34]**

La teneur en huile essentielle des végétaux est généralement faible de l'ordre de 1%. Il existe toute fois quelques exceptions comme la badiane de chine dont la teneur en essence est supérieure à 5% ou bien entendu le clou de girofle qui referme plus de 15%.

Les concentrations des plantes en huiles essentielles sont généralement très faibles : à titre d'exemple, voici la quantité de plantes nécessaire pour obtenir un flacon de 30ml d'huile essentielle (30ml =  $\frac{1}{3}$  d'un dixième de litres).

Cannelle : 7,5 kg	Marjolaine : 30 kg
Menthe : 12 kg	Oranger : 30 kg
Romarin : 2 kg	Thym : 25 kg
Rose : 600 kg	Violette : 1000 kg

On voit que le rendement est très variable d'une espèce à l'autre mais de toute façon très faible, ce qui explique le prix élevé de certaines huiles essentielles. Ces chiffres sont indicatifs et sujets à variations d'une année à l'autre et d'une région de production à l'autre pour une même plante. En effet, l'huile essentielle d'une plante donnée n'est pas une substance donnée : sa composition est variable d'une variété à l'autre et dépend de plus des qualités du terrain dans lequel la plante a été cultivée. C'est ainsi qu'il existe par exemple plusieurs qualités d'huiles essentielles de Lavande : Lavande Mont Blanc, Lavande Provence, Lavande altitude, etc.

#### IV. Propriétés physiques des huiles essentielles. [34]

Les huiles essentielles forment un groupe homogène quant à leurs propriétés physiques :

- Etat liquide en général à température ambiante.
- Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et perdent rapidement leurs propriétés. Elles commencent à vieillir au bout de six mois et on admet qu'elles n'ont pratiquement plus de propriétés thérapeutiques après deux années.
- Elles sont incolores à jaune pâle à quelques exceptions telle que l'huile essentielle de camomille dont la couleur bleue claire est due à la présence de chamazulène et le bouleau de couleur noire.
- Densité inférieure à l'unité, exception faite des huiles essentielles de cannelle, girofle et sassafras.
- Indice de réfraction et pouvoir rotatoire généralement élevés puisque composés principalement de molécules asymétriques.
- Les huiles essentielles sont solubles dans l'alcool, dans l'éther, et dans la plupart des solvants organiques, mais insolubles dans l'eau. Elles sont rarement utilisées pures à cause de leur haut pouvoir d'action. Les huiles seront ainsi souvent diluées dans des solvants gras pour obtenir un produit directement applicable sur la peau : huiles de massage, produit pour le bain par exemple. Quand on veut diluer les huiles essentielles avec l'eau, on utilise un « mouillant » qui va permettre d'obtenir une émulsion – mélange homogène de produits huileux et d'eau. C'est le cas des produits aromatiques pour le bain et de certains laits de beauté.
- Sensible à l'oxydation, elles ont également tendance à se polymériser pour former des produits résineux.
- L'odeur caractéristique des huiles essentielles explique leur utilisation dans les parfums, surtout pour les huiles essentielles de fleurs. Elles sont alors diluées dans l'alcool.
- Elles perdent d'autant plus rapidement leurs propriétés qu'elles sont exposées à la chaleur ou même à la lumière. C'est pour cette raison que toutes les huiles essentielles doivent impérativement être présentées dans des flacons opaques, par exemples en verre teinté, de préférence auto jointés c'est – à – dire avec un bouchon scellé.
- Leur point d'ébullition se situe entre 60° et 240°C.

## V. Composition chimique des huiles essentielles. [38]

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent de façon quasi-exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatique dérivés du phénylpropane (beaucoup moins fréquent) d'autre part.

### a. Les terpénoïdes.

Les terpénoïdes rencontrés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatils c'est à dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : ce sont les mono et sesquiterpènes.

➤ **Les monoterpènes**, les carbures monoterpéniques sont presque toujours présents, ils peuvent être acycliques (myrcène, ocimène...), monocycliques ( $\alpha$  et  $\gamma$ -terpinène, p-cymène...) ou bicycliques (Pinène, camphène, sabinène...) ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (citrus, térébenthine). En plus de ces carbures, plusieurs molécules fonctionnalisées sont rencontrées telles que :

**Les alcools** : ils peuvent être acycliques (géraniol, linalol...), monocyclique (menthols,  $\alpha$ -terpinén-4-ol...), bicycliques ( bornéol, fenchol...).

**Les aldéhydes** : le plus souvent ils sont acycliques (géraniol, néral, citronellal...)

**Les cétones** : acycliques (tagétone), monocyclique (menthone, carvone ..).

**bicycliques** : (camphre, fenchone, thuyones...).

**Les esters** : pouvant être acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle); monocycliques (acétate de menthyle...), bicycliques (acétate d'isobornyle).

**Les éthers** : cinéole (appelé également eucalyptol).

**Les peroxydes** : ascaridole.

**Les phénols** : thymol, carvacrol.

➤ **Les sesquiterpènes**, les mêmes familles chimiques rencontrées dans la série des monoterpènes se retrouvent dans cette série : les carbures ( $\beta$ - bisabolène,  $\beta$ -caryophyllène), les alcools (farnésol, carotol,...), les cétones (nootkatone,  $\beta$ -vétivone...), les aldéhydes (sinalal...), les esters (acétate de cédryle..).

### **b. Les composés aromatiques.**

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane ( $C_3-C_6$ ) sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Ce sont très souvent des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles d'Apiaceae (anis, fenouil, persil...), anéthol, anisaldéhyde, apiole, méthyl – chavicol ..., mais aussi de celles de la girofle, de la muscade de l'estragon, de l'acore, des cannelles (eugénol, myristicine, asarones, cinnamaldéhyde...) des composés en  $C_1-C_6$  comme la vanilline ou l'antranilate de méthyle peuvent être également rencontrés dans les huiles essentielles.

### **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, entraînable lors de l'hydrodistillation, carbures (linéaires et ramifiés, saturés ou non), acides ( $C_3$  à  $C_{10}$ ), alcools, aldéhydes, esters acycliques, lactones.

Dans les concentrés, il n'est pas rare de trouver des produits de masse moléculaire plus importante non entraînable à la vapeur d'eau : homologues des phénylpropanes, diterpènes coumarines etc.

## **VI. Qualité des huiles essentielles. [34]**

Pour obtenir une huile essentielle de qualité, il est préférable de distiller des plantes sauvages ou de culture biologique plutôt que des plantes cultivées chimiquement. La partie de la plante distillée a également son importance. Certains principes actifs de l'huile essentielle vont se retrouver dans des parties différentes suivant les plantes. Le pays d'origine, par la qualité de l'ensoleillement et les caractéristiques du terrain de récolte mais aussi par la laxité des contrôles effectués, influence aussi sur la qualité de l'huile essentielle.

Les différentes variétés d'une même plante donneront des huiles essentielles ayant des propriétés différentes. Toutes les huiles essentielles de romarin ne sont pas identiques par exemple.

Pour résumer, les indications qui doivent figurer sur un flacon d'huile essentielle de façon à garantir sa qualité sont : le nom courant de la plante, la variété botanique (en général en latin), la partie de la plante distillée, la région et le pays d'origine.

## **VII. Facteurs de variabilité des huiles essentielles.**

La composition et le rendement des huiles essentielles peuvent varier selon l'âge, le cycle végétatif de l'organe, et le mode d'extraction, les facteurs climatiques et la nature du sol.

Un climat sec et ensoleillé favorise la formation des huiles essentielles. Les principales familles à essences sont méditerranéennes (Lamiacées, rutacées, myrtacées...) ou des régions chaudes (térébinthacées...). Par contre certains taxons sont généralement cantonnés aux régions tempérées ou froides comme les renonculales et les primulales [34,37].

La nature du sol agit aussi sur la composition : par exemple un taux élevé en 1,8 – cinéole a été observé par Mario et al, (1998) [39] chez le romarin poussant sur un sol calcaire. Les pratiques culturales sont caractérisées par un composé préférentiel : le thymol, et le carvacrol.

Les procédés d'obtention des huiles essentielles peuvent aussi avoir une influence sur sa composition. Ainsi, au cours de l'hydrodistillation certains composés peuvent subir certaines transformations : hydrolyse, réarrangement, oxydations etc. [8].

### **VIII. Fonctions biologiques des huiles essentielles.**

La localisation des huiles essentielles leurs confèrent un rôle répulsif vis à vis des prédateurs et des pollinisateurs. La teneur élevée du feuillage en essence (laurier, lamiacées...) a un effet répulsif pour les herbivores. La présence des huiles essentielles au niveau des racines (vétiver, gingembre), les écorces (cannelle), le bois (santal) correspond à un effet antiseptique vis à vis des parasites présents dans le sol ou pouvant attaquer le bois.

Sur le plan du métabolisme de la plante, certains terpènes linéaires ont une fonction énergiques : mis en réserve pendant le jour ils sont dégradés durant la nuit en acétyl- COA.

### **IX. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles. [38]**

Il arrive souvent que l'on confonde l'activité d'une huile essentielle avec celle de la plante dont elle est issue. Il faut savoir qu'une telle superposition n'est que rarement possible. Ainsi, l'huile essentielle de romarin est antibactérienne alors que l'infusé de la même espèce est traditionnellement utilisé pour le traitement symptomatique de troubles digestifs divers.

Par ailleurs, si l'on peut étudier et décrire les effets biologiques ou pharmacologiques d'un monoterpène, d'un sesquiterpène ou d'un alkylbenzène purs, il est difficile, parfois impossible, de parler de pharmacologie d'une huile essentielle c'est à dire d'un mélange.

L'éventail des propriétés attribuées (parfois expérimentalement démontrées) aux huiles essentielles est assez large; cependant quelques propriétés fondamentales se

dégagent parmi lesquelles nous pouvons citer : le pouvoir antiseptique, les propriétés spasmolytiques, sédatives et irritantes.

### **X. Toxicité des huiles essentielles.** [38,40,41]

Les huiles essentielles peuvent aussi être toxiques à des doses élevées. Ainsi, celle du romarin est cholérétique, duretique et provoque une action spasmolytique due au bornéol.

En générale chez l'homme l'ingestion de 10 à 30ml d'une huile essentielle peut être mortelle. A des doses plus faibles on note des troubles digestifs, de l'hypotension, de l'hypothermie et une confusion mentale.

### **XI. Utilisation des huiles essentielles.**[34]

L'industrie du parfum est le débouché principal des huiles essentielles, des concrètes, des absolues et autres résinoïdes. La cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, même si le coût souvent élevé des produits naturels conduit à privilégier les produits synthétiques.

Certaines huiles essentielles sont aussi utilisées dans l'industrie pharmaceutique, en particulier dans le domaine des antiseptiques externes, et plus généralement pour l'aromatisation des formes médicamenteuses destinées à être administrées par voie orale. Les huiles essentielles constituent également le support d'une thérapie particulière : l'aromathérapie.

Les huiles essentielles trouvent également des applications dans diverses industries telles que les industries agro-alimentaires (tous les secteurs alimentaires sont consommateurs : boissons non alcoolisées, confiserie, produits laitiers, soupes, sauces, snacks, boulangerie sans oublier la nutrition animale), et les industries chimiques qui utilisent des isolats (substances pures isolées des huiles essentielles) comme matière première pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes etc. Les isolats sont également utilisés en parfumerie.

### **XII. Conservation des huiles essentielles.**[36,38]

La relative instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles rend leur conservation difficile; de ce fait, les possibilités de dégradation sont nombreuses. Il est possible de limiter celles-ci en utilisant des flacons de faible volume en aluminium, en acier inoxydable ou en verre brun, entièrement remplis et fermés de façon étanche, stockés à basse température, ou conservés sous atmosphère d'azote. Il est possible de recourir à l'adjonction d'antioxydants.

### **XIII. Les différents modes de production des huiles essentielles.**

#### **XIII.1. Procédés mettant en jeu la vapeur d'eau.**

Ce type de procédé permet de produire des essences distillées ou huiles essentielles selon l'appellation normalisée. Le terme huile fait référence à leur nature lipophile qui permet de les séparer du vecteur d'extraction par simple décantation, le vocable essentielle à l'essence native originelle. En outre, en raison de modifications chimiques se produisant lors du traitement, leur composition diffère de celle de l'essence.

##### **a. Entraînement à la vapeur d'eau.**

Le procédé d'entraînement direct à la vapeur d'eau consiste à soumettre le matériel végétal à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés organiques volatils sont condensées; ceux-ci ensuite récupérés par décantation. Ce procédé permet de traiter les matières végétales sensibles qui pourraient souffrir d'une ébullition prolongée.

##### **b. Hydrodistillation.**

Le matériel végétal est dans ce cas immergé dans l'eau portée à ébullition. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau produite par le bain aqueux. L'huile essentielle est recueillie après décantation comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau.

#### **XIII.2. L'expression.**

L'expression est le seul procédé de traitement des plantes aromatiques ne mettant pas en œuvre un fluide en phase d'extraction. Il consiste soit à exprimer les péricarpes isolément sous un courant d'eau, soit à écraser les fruits entiers entre des cylindres métalliques. Les essences, de faible densité, appelées également huiles essentielles, sont ensuite séparées de la phase aqueuse (eau d'entraînement ou jus de fruit) par centrifugation.

L'expression à froid répond à la double particularité des huiles essentielles d'hésperidées. D'une part, celles-ci sont principalement constituées d'hydrocarbures terpéniques peroxydables et polymérisables, donc sensibles aux températures d'hydrodistillation. D'autre part, elles sont localisées dans un péricarpe poreux aisément détruit. De ce fait, elles sont récupérées par simple action mécanique.

### **XIV. Méthodes d'analyse des huiles essentielles. [37,42]**

Etant donné le nombre élevé et la diversité des constituants d'une huile essentielle, la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire en programmation de température est le mieux adaptée pour la séparation et l'analyse de



ces mélanges complexes. Couplée à la spectrométrie de masse, elle permet l'identification de la plupart des constituants.

#### XIV.1. Chromatographie en phase gazeuse. (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les premières applications remontent au début des années 40. Elles ont concerné le contrôle des fractions légères des raffineries de pétrole. Son développement qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême sensibilité; à sa polyvalence, permise par les nombreuses phases stationnaires commerciales, et à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles.

La séparation sur la colonne se faisant sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des composés liquides ou solides impose de pouvoir les porter à l'état de vapeur par chauffage. Les applications sont très nombreuses dans les domaines des analyses pétrochimiques, pharmaceutiques, de l'environnement,...

L'élément principal de la CPG est la colonne qui contient la phase stationnaire (liquide ou solide). Cette dernière est traversée par une phase mobile (gaz inerte) qui transporte le soluté volatilisé à analyser. La séparation des constituants du soluté se fait selon un coefficient d'affinité.

A la sortie de la colonne est placé un détecteur qui permet d'enregistrer en continu la variation de la concentration en fonction du temps sous forme d'un chromatogramme.

#### XIV.2. La spectrométrie de masse. (SM)

La spectrométrie de masse (SM) désigne une méthode d'analyse qui repose sur la détermination des masses des espèces atomiques ou moléculaires individuelles de l'échantillon analysé, ce qui permet de recueillir des informations sur sa nature, sa composition et même sur sa structure [40].

La spectrométrie à déviation totale comprend (figure 3).

- **Un repousseur** (repeller) il vient juste après la tête de l'appareil, son rôle est de pousser les ions de la source.
- **La zone d'ionisation** où a lieu l'ionisation. La température de cette zone peut dépasser 200°C. Il existe deux types d'ionisation :
  - Ionisation chimique
  - Ionisation électronique
- **Deux petits aimants** placés de part et d'autre de la source donnent une trajectoire hélicoïdale à ce flux d'électrons.

- **La zone d'accélération** : les ions subissent une première accélération par un champ électrostatique, et une 2<sup>ème</sup> accélération par un second champ électrostatique beaucoup plus élevé donnant aux ions leurs vitesses définitives.
- **Un tube analyseur et aimant** : le faisceau d'ions le parcourt vers le collecteur.
- **Le collecteur** : mesure le courant d'électrons émis par le filament qui passe vers l'amplificateur.
- **Enregistreur** : enregistre l'intensité des ions fragments.

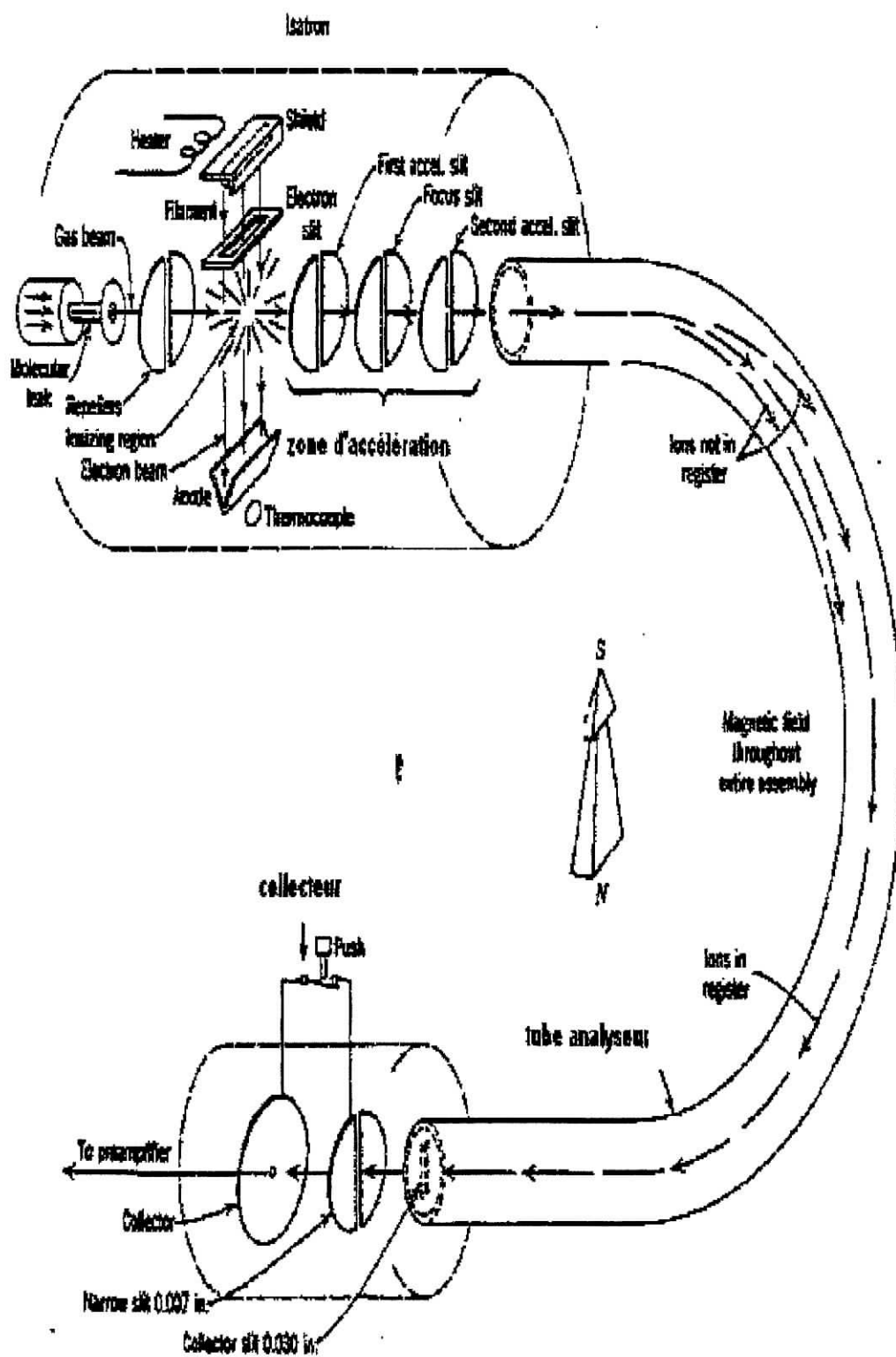


Figure 3 : Schéma d'un spectromètre de masse

### **XIV.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. (CG/SM)**

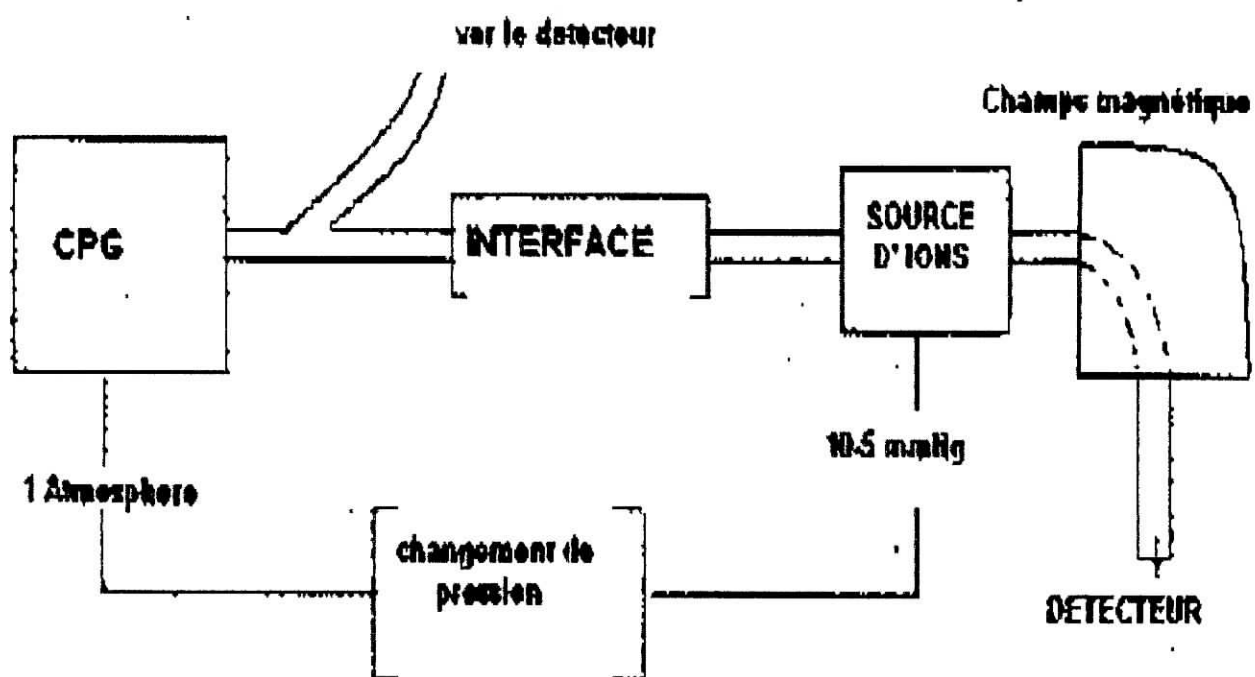
Le chromatographe opère à pression atmosphérique, alors que le spectromètre de masse doit être maintenu sous vide poussé. Suivant le type de colonnes deux cas se présentent :

Dans le cas des colonnes remplies le flux gazeux est trop important pour pouvoir être envoyé directement dans la source du spectromètre de masse. Dans ce cas, une partie du flux gazeux de sortie du chromatographe est prélevée à l'aide d'une interface et introduite dans le spectromètre de masse (figure 4).

Dans le cas de colonnes capillaires, le flux total peut être envoyé dans la source du spectromètre de masse grâce à l'utilisation de pompes puissantes. Le couplage direct est réalisé via un bloc chauffé, ainsi l'extrémité de la colonne peut être amenée directement au niveau de la chambre d'ionisation.

Les différentes molécules qui sortent de la colonne capillaire du chromatographe en phase gazeuse sont introduites dans la zone d'ionisation du spectromètre de masse où elles sont bombardées par un faisceau d'électrons émis par un filament incandescent qui les fragmente en ions positifs qui seront séparés en fonction de leur masse et plus précisément de leur rapport (masse/charge), puis la répartition sera donnée sous forme d'un spectre de masse. Pour la plupart des constituants les spectres sont uniques ce qui permet de les identifier.

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



**Figure 4** : Principe de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

# **CHAPITRE III**

## **APERCU GENERAL SUR LA BIOLOGIE DU *RHYZOPERTHA DOMINICA***

# III

## APERCU GENERAL SUR LA BIOLOGIE DU RHYZOPERTHA DOMINICA

Depuis que les graines sont stockées par l'homme, le problème de leur conservation est posé. Elle consiste à mettre hors d'atteinte des intempéries, des dégradations d'origine biologiques dues à des être vivants (rongeurs, oiseaux, insectes, acariens et micro-organismes), d'autres agressions d'origine enzymatiques, biochimiques, et mécaniques des masses de graines plus ou moins importantes pour des durées variables.

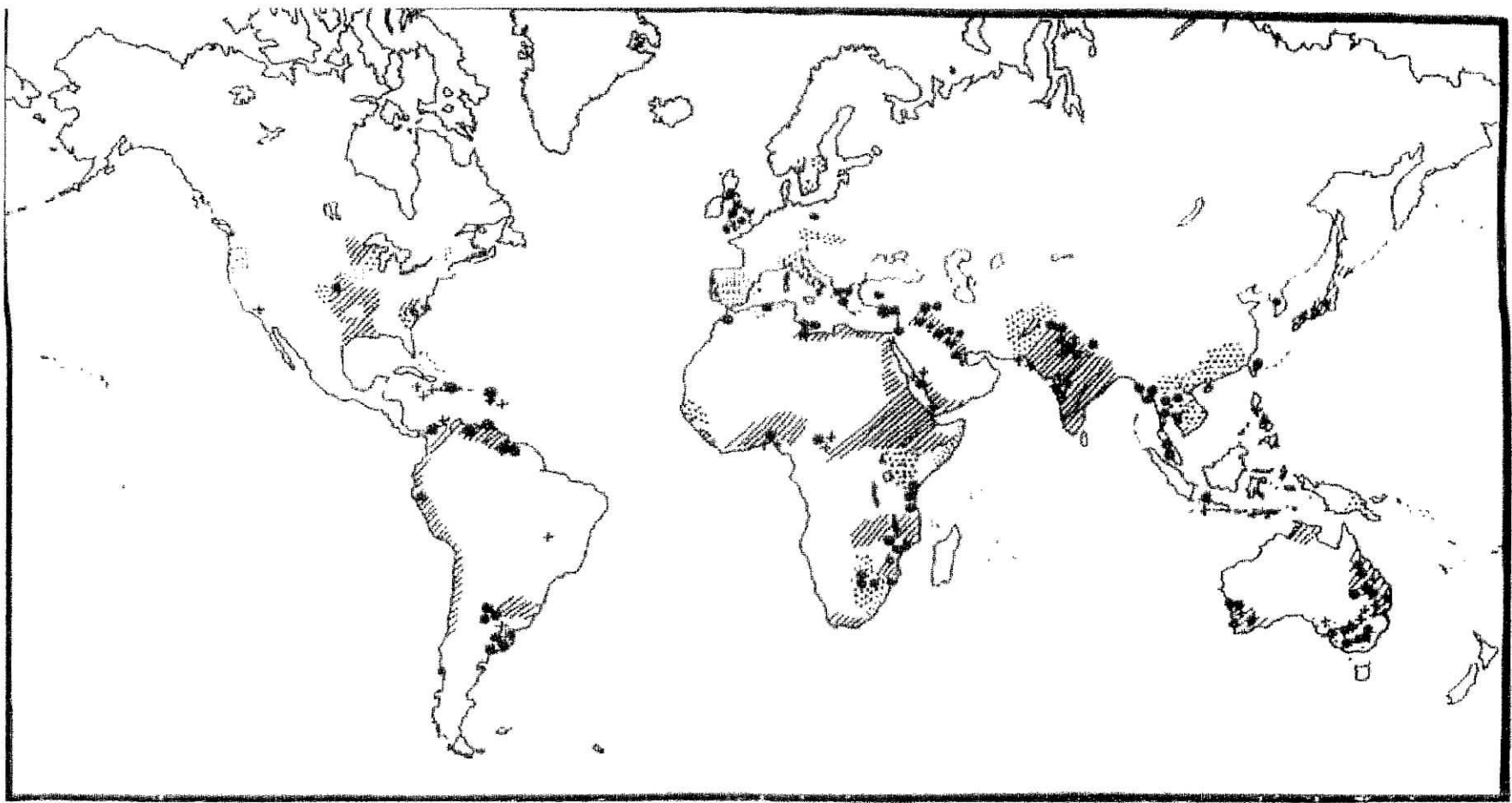
Dans notre étude, on s'est intéressé à l'étude de la toxicité de deux huiles essentielles sur un ravageur de céréale «*Rhyzopertha Dominica*»; pour cela on va essayer de donner un aperçu général sur la biologie de cet insecte.

### **I. Origine et répartition géographique. [43,44,45,46]**

Divers auteurs pensent que le *Rhyzopertha Dominica* (figure 5) est originaire de l'Inde ou l'Indonésie. C'est un insecte introduit dans les grands ports d'Europe avec les arrivages de grains. Il a été introduit aux Etats unis avec les cargaisons de blé infesté en provenance d'Australie au cours de la première guerre mondial. Cette espèce est répandue dans toutes les contrées tropicales et subtropicales du globe. Il est vraisemblable qu'on l'a importé en Amérique et en Australie où elle se montre fortement dangereuse.

Cet insecte est nettement établi en Afrique du Nord, dans toute la région éthiopienne, à Madagascar, en Egypte, en Mésopotamie, au Japon, en Australie, aux Etats-Unis et en Amérique tropical. Sa zone d'habitat semble s'étendre entre le quarantième degré de latitude nord et le quarantième degré de latitude sud.

Cependant, il n'y a pas lieu de craindre son acclimatation en Europe occidentale, en raison des températures assez élevées qu'exige son développement.



Resistance au malathion chez *Rhyzopertha dominica*

- + Résistant
- \* Sensible

Nocivité




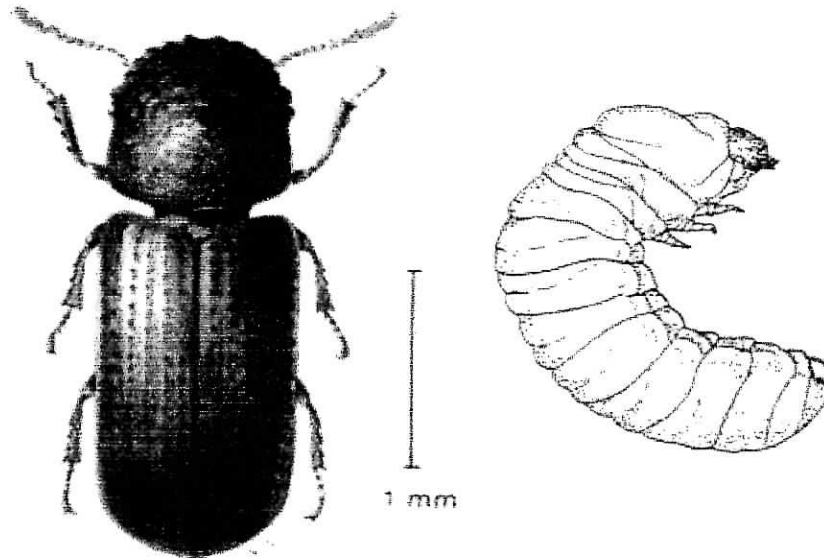
-  Très nuisible
-  Assez nuisible
-  Peu nuisible

Figure 6 : Répartition géographique de *Rhyzopertha Dominica*



A l'échelle nationale ses dégâts sont à redouter car le climat algérien est favorable à sa prolifération [47]. La figure 6, nous indique la répartition et la nocivité de cet insecte dans les divers pays [46].



**Figure 5 :** *Rhyzopertha Dominica*

## II. Régime alimentaire et dégâts.

Il s'agit évidemment d'un insecte adapté secondairement aux grains, mais vivant normalement de bois d'essences diverses [43]. Ce petit capucin des grains a été trouvé sur plusieurs produits alimentaires, selon l'ordre chronologique donné dans le tableau II.

Cet insecte est essentiellement adapté à un régime cléthrophone et s'attaque aux grains de Graminées : blé, orge, riz, maïs, et petit mil, où il est souvent associé à *Sitophilus oryzae* (L) et à d'autres déprédateurs des grains [45]. Il peut se développer dans des grains d'autres céréales comme l'avoine et même sur leur farine.

Il présente une importance économique considérable comparable à celle de la calandre du riz *S. oryzae* (L). Les adultes causent des dégâts au moins aussi importants que ceux de leurs larves, sinon plus. Ils mordent l'enveloppe des grains, et sitôt arrivés dans la partie amylacée, ils l'abandonnent pour en attaquer un autre jusqu'à l'évider complètement. Leurs excréments contiennent l'amidon non digéré, ce qui porte à croire que leur alimentation a lieu plutôt aux dépens des enveloppes du grain que de son contenu.

**Tableau II** : Régime alimentaire de *Rhyzopertha Dominica* [43,45]

Année	Produit alimentaire	Pays
1822	Racines de Rhubarbe officinale	Londres
1822	Rhizomes d' <i>Alpinia officinarum</i> (Hance)	Italie
1849	Ecorces de <i>Quercus suber</i> et de <i>cystisus spinosus</i>	Algérie
1854	Tiges d'Arrow-Root (fécule comestible que l'on retire des rhizomes ou des bulbes de Scitaminales)	Non cité
1857	Grains de céréales attaqués par un insecte nommé <i>Apate frumentarius</i> (Nordl).	Egypte
1878	Dégâts sur des milliers de kilos de biscuits conservés pour la troupe	Brest
1882	Blé provenant du Pérou, sorgho et bulbes desséchées, pain tiré de ces bulbes destiné à la nourriture des Indiens, de navet des prairies, liège qui tapissait le fond des vieilles boîtes de collection dans un musée	Amérique
1883	Bois des caisses à sucre	Amérique centrale
1893	Très nuisible dans les réserves de biscuits	Non cité
1893	Racines de manioc et patates sèches	Non cité
1903	Licol de cheval	Amérique
1903	Au bureau entomologique dans des papier qu'il détruit en partie	Calcutta
1911	Caisses de riz importées	Etats-Unis
1911	Bois d'œuvres	Tonkin
1911	Bois de réglisse	Cette
1924	Un arbre appartenant au genre <i>quassia</i>	Guinée française
1933	Bois d' <i>Antocarpus hirsutus</i>	Non cité
1935	Dans plant de maïs, Bombous sur pied	Non cité

### III. Description des différents états du cycle biologique de l'insecte.

#### III.1. L'œuf.

Les œufs (figure 7) sont piriformes et allongés, ils mesurent 0.6 mm de longueur sur 0.2 mm de largeur [43]. Au moment de la ponte, ils sont de couleur blanche, deviennent ensuite rose à l'extrémité puis redeviennent blancs opaques peu avant l'éclosion [45].

**III.2. La larve du premier stade.** [42,45,48]

La jeune larve est microscopique, blanche, presque linéaire. La tête est légèrement jaunâtre. Cette jeune larve très agile possède trois paires de pattes relativement bien développées comme tous les Bostrychides. Son thorax est faiblement épaissi. Sa tête et ses segments abdominaux sont ornés de longues soies. Elle est décorée sur son segment anal d'un petit crochet brun (cerque). Ce dernier est légèrement incurvé au milieu de la surface dorsale.

**III.3. La larve du deuxième stade.**

Elle est légèrement plus grande que la larve du premier stade. Elle diffère de cette dernière par l'absence du petit crochet anal, perdu lors de la mue, et par sa moindre agilité [46].

**III.4. La larve du troisième stade.**

Plus grande que la larve du deuxième stade, la larve du troisième stade présente un thorax plus épaissi et des mandibules plus sclérifiés.

**III.5. La larve du quatrième stade.**

La taille de cette larve est d'environ 2 mm, son corps est plus épaissi que celui de la larve du troisième stade et des mandibules deviennent plus sclérifiés [46].

**III.6. La larve du dernier stade.**

Le corps de la larve âgée s'arque plus fortement, le thorax n'est que faiblement élargi, la tête est brunâtre et les mandibules longues et puissantes sont d'un brun sombre [44].

Le segment anal de cette larve est renflé, comprimé et ramené en dessous de l'abdomen. Ses segments thoraciques portent six pattes articulées brunes et bien développées.

L'abdomen est hérissé de soie brune dans sa partie dorsale [43]. La longueur maximum de la larve du dernier stade est de 2,8 mm [45]. Ses puissantes mandibules lui permettent de mordre elle-même les grains de céréales sains et les vider entièrement, n'en laissant que l'enveloppe. A ce niveau les dégâts deviennent plus importants [47].

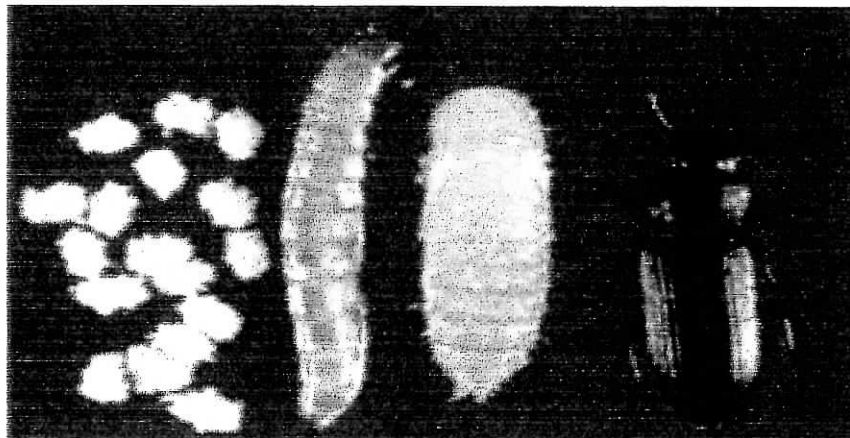
**III.7. La nymphe.** [49]

Elle est libre, blanche, recouverte de poils sur la surface dorsale, elle constitue le seul stade de la vie de *Rhyzopertha Dominica* où les caractères secondaires sexuels

permettent de distinguer les sexes. L'état nymphal se considère à partir du jour où l'insecte est immobile et ne s'alimente pas.

### III.8. L'imago. [43,45,49]

*Rhyzopertha Dominica* est un petit insecte de forme allongée, cylindrique et étroit. Sa longueur varie de 2,3 à 3 mm. Sa couleur est brune ou jaune rougeâtre. La tête est globuleuse et entièrement cachée par le prothorax qui la recouvre complètement. Les antennes sont constituées de dix articles dont les deux premiers sont subégaux et les trois derniers fortement dilatés, triangulaires et pubescents. Le pronotum très bombé et volumineux cache la tête. Il est presque aussi large que long, légèrement élargi en arrière et largement arrondi aux quatre angles. Sur sa moitié antérieure se trouvent des dents nombreuses plus ou moins saillantes. Les pattes sont petites à tibias denticulés, les tarses ont cinq articles. Les élytres sont deux fois et demi plus longs que larges, arrondis en arrière, marqués de stries disposées longitudinalement. La partie postérieure est convexe et parsemée de granulations râpeuses. Le pygidium est invisible vu de face dorsale. L'insecte est considéré adulte lorsqu'on remarque la présence de farine autour du grain.



**Figure 7 :** Cycle biologique du *Rhyzopertha Dominica*

### IV. Le cycle de développement. [42,44,47]

L'activité des adultes ne commence pas avant le mois de mai. Nous pouvons trouver la larve et l'adulte en hiver mais ce n'est seulement qu'en avril ou mai, quand les températures sont élevées, que l'accouplement et la ponte ont lieu.

Après l'accouplement, les femelles pondent à plusieurs reprises. Les œufs sont disposés à l'intérieur des grains attaqués ou à la surface, parfois parmi les débris qui gisent entre eux, ceux-ci sont déposés isolément ou en petits amas. Les pontes

s'échelonnent sur plusieurs semaines et cessent en automne. Les jeunes larves sont incapables d'entamer des grains sains. Elles s'introduisent dans les grains à l'issue des fissures provoquées par le choc des machines avant le stockage, au cours du transport ou par les morsures des insectes au champs. Arrivés au terme de leur développement, les larves nymphosent. Quelques jours après, les imagos émergent et ne sortent des grains qu'après maturation sexuelle.

Il peut y avoir quatre à cinq générations chevauchante par an. En hiver, le développement décroît considérablement et l'hivernation a lieu à tous les stades. La durée du cycle varie avec la température.

#### **V. Moyens de lutte.**[49]

Les principales méthodes de désinsectisation utilisées sont répertoriées dans le tableau III suivant :

**Tableau III** : Les principales méthodes de désinsectisation utilisées dans le monde

<b>Méthodes</b>	<b>Exemples</b>
Lutte par des substances chimiques	<ul style="list-style-type: none"><li>- Substances à tension de vapeur relativement faible</li><li>- Substances à tension de vapeur élevée ou fumigants</li></ul>
Lutte par la température	<ul style="list-style-type: none"><li>- Lutte par le froid : Le développement des insectes est temporairement arrêté au dessous de 10°C.</li><li>- Lutte par la chaleur : Le séchage des céréales en cours de stockage</li></ul>
Stockage étanche ou sous atmosphère inerte	<ul style="list-style-type: none"><li>- La respiration des grains en début de conservation fait s'élever dans l'enceinte la teneur en gaz carbonique provoquant la mort des insectes par privation d'oxygène et la stabilisation de l'état sanitaire.</li><li>- Chasser l'air de la cellule par un gaz inerte, comme le gaz carbonique ou l'azote, et de maintenir ensuite une pression légèrement supérieure à la pression atmosphérique, avec une teneur en oxygène inférieure à 0,5 %</li></ul>
Lutte par irradiations ionisantes	<ul style="list-style-type: none"><li>- Empêche la reproduction des insectes parasites des grains, par exemple : il est possible de les traiter avec une bombe de cobalt de forte puissance.</li></ul>

**Tableau III :** Les principales méthodes de désinsectisation utilisées dans le monde (suite)

<b>Méthodes</b>	<b>Exemples</b>
La destruction par les ondes électromagnétiques non ionisantes	- L'utilisation de rayonnement du type micro-ondes ou hautes fréquences
La phytothérapie	- L'utilisation des végétaux sous forme de poudre - L'utilisation des végétaux sous forme d'huiles essentielles - L'utilisation des végétaux sous forme d'extraits aqueux

# **CHAPITRE IV**

## **ETUDE DE LA TOXICITE**



# IV

## ETUDE DE LA TOXICITE

### **I. Définition de la toxicité. [50]**

La notion de toxicité est une notion relative. Plusieurs auteurs considèrent qu'est toxique toute substance qui, après pénétration dans un organisme en une ou plusieurs fois très rapprochées, provoque un trouble de façon passagère ou durable. Une substance toxique n'est donc pas forcément mortelle.

### **II. Caractères généraux des essais de toxicité.**

Les essais de toxicité sont des essais biologiques. Ils ont pour objet de mesurer l'effet d'un stimulus quelconque au moyen de l'observation des réactions qu'il détermine dans la matière vivante. On les utilise, pour permettre l'usage pratique d'un stimulus, l'intensité de celui-ci doit être traduite en unité biologique exploitables.

Les réponses d'organismes vivants à un stimulus sont très diverses et impossibles à produire identiquement d'un individu à l'autre. D'où la nécessité de recourir à la loi des grands nombres, c'est à dire de travailler sur des populations d'où celle de mettre en œuvre des méthodes statistiques.

Le critère biologique que l'on choisit pour traduire l'effet d'un stimulus doit être adapté au sujet de recherches. Pour les prédateurs, l'observation de la mortalité s'avère la plus commode (certitude du diagnostique). Ce type d'observation s'appelle quantal car il s'agit d'un tout ou d'un rien.

Quand on se fixe comme critère de réponse le quantal, il existe un niveau du stimulus appelé seuil de tolérance:

- Au dessous duquel il n'y a pas de réponse (pas de mort)
- Au dessus duquel il y a réponse (mort)

Ce seuil de tolérance varie dans des larges limites, selon les individus qui constituent une population.

L'objet des essais biologiques est d'établir la distribution des seuils de tolérances dans la population étudiée

Soit  $z$  l'intensité de stimulus

on a :

$$dP = f(z) dz \quad (1)$$

Cela veut dire qu'une partie  $dP$  de la population est constituée d'individus dont le seuil de tolérance se situe entre  $z$  et  $z + dz$ , où  $dz$  représente un très petit intervalle de l'échelle d'intensité du stimulus et où  $dP$  est la grandeur de cet intervalle multipliée par la valeur appropriée de la distribution de fonction  $f(z)$ .

Si on administre une dose  $z$  à une population d'insectes, tous les individus dont le seuil de tolérance se situe au dessus de  $z_0$  vont répondre (mort) et la proportion ( $P$ ) de ceux-ci dans l'ensemble de la population est :

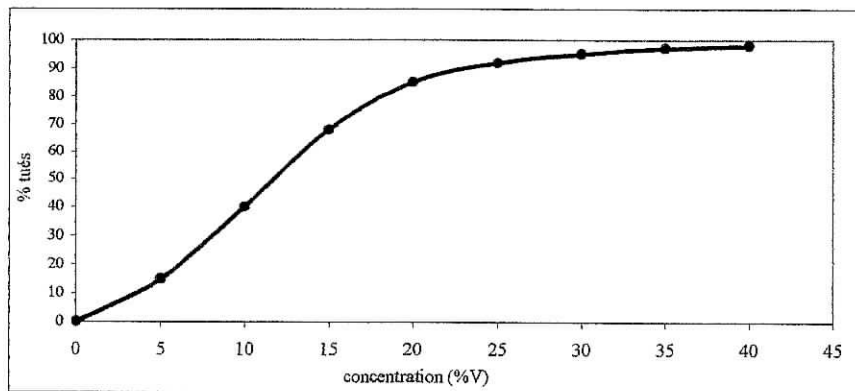
$$P = \int_{z_0}^z f(z) dz \quad (2)$$

A la limite , l'ensemble de la population est considéré comme donnant une réponse pour une dose infinie, soit :

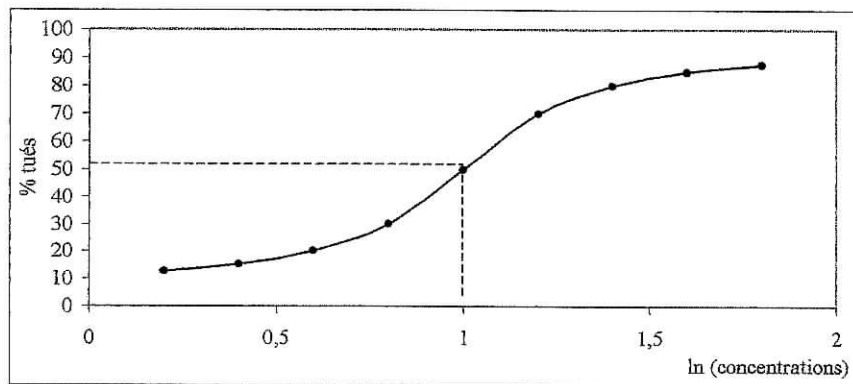
$$P = \int_{z_0}^{\infty} f(z) dz = 1 \quad (3)$$

Dans les essais biologiques de réponses type quantal, des pourcentages des seuils de tolérances en fonction de la concentration d'un toxique se répartissent graphiquement selon une sigmoïde.

Exemple :



Par transformation logarithmique des concentrations, on obtient une sigmoïde normale de Gauss présentant un centre de symétrie.



Ces courbes rendent compte que les pourcentages nul (0) ou total (100) ne sont atteints que ne se produit jamais dans la réalité.

### III. La dose efficace moyenne.

Pour caractériser l'efficacité d'une intensité d'un stimulus, ne serait ce que pour comparer celui ci avec des stimuli d'autres natures, il faut choisir une effet standard.

- La dose efficace minimale.
- La dose efficace maximale.

Mais celles-ci sont mal représentatives de la population car situées aux extrémités de la courbe, elles ne rendent compte que des cas exceptionnels de sensibilité ou de tolérance de l'échantillon.

on détermine l'efficacité du produit utilisé par de deux manières :

- La première consiste à déterminer la mortalité  $y$  après un temps constant en fonction des doses croissantes du toxique  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ . Ce qui conduit à établir une courbe expérimentale représentative de la fonction  $y=f(x)$  à partir de laquelle on calculera la  $DL50$ , définie comme étant la dose létale qui donne 50% de mortalité.
- La seconde consiste à déterminer les mortalités consécutives à l'application d'une dose constante en fonction de temps croissants  $t_1, t_2, t_3, \dots, t_n$ . Ce qui conduit à établir, cette fois-ci, une courbe expérimentale représentative de la fonction  $y=f(t)$  à partir de laquelle on calculera le  $TL50$ , qui est le temps léthal qui donne 50% de mortalité.

La  $DL50$  (dose létale 50) est la dose nécessaire et suffisante pour tuer la moitié d'une population. Pour une distribution quelconque de seuil de tolérance, la  $DL50$  satisfait à :

$$\int_0^{\infty} f(z)dz = 0.5 \quad (4)$$

Après transformation logarithmique des doses, la distribution devenue normale, du seuil de tolérance  $x$  s'exprime par :

$$dP = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} dx \quad (5)$$

Où :

$\mu$  : est le centre de distribution , c'est à dire la valeur de la dose pour le seuil moyen de tolérance, ou seuil moyen d'efficacité. Donc  $\mu$  est  $\text{Ln}(DL50)$

$\sigma^2$  : est la variance de  $\mu$  ( $\sigma$  est sont écart -type).

La  $DL50$  a elle seule ne décrit pas pleinement l'efficacité d'un poison.

#### IV. Estimation de la DL50.

Pour estimer  $\mu$  ( $\ln(DL50)$ ) et  $\sigma^2$  (la variance) de la distribution du seuil de tolérance, on se sert de transformation en «probits» des résultats expérimentaux, auxquels on applique l'équation précédente.

Le probit de la proportion  $P$  est l'abscisse qui correspond à une probabilité  $P$  dans une distribution normale de variance 1 et de moyenne 5.

La valeur 5 est choisie, de façon à décaler l'échelle de sorte d'en éliminer les valeurs négatives difficiles à interpréter. Donc, par définition le probit  $P$  est  $y$ , tel que :

$$P = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{y-5} e^{-\frac{u^2}{2}} du \quad (6)$$

Ainsi, pour un stimulus  $x_0$ , la proportion prévisible d'insectes tués est :

$$P = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{x_0} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} dx \quad (7)$$

Des deux précédentes relations, il ressort que le probit de la proportion d'une population donnant une réponse linéaire avec la variable  $\ln(\text{dose})$  est égal à :

$$y = 5 + \frac{1}{\sigma}(x - \mu) \quad (8)$$

#### V. Les droites de régression.

Les valeurs numériques obtenues permettent de tracer empiriquement des diagrammes. Ces derniers ne permettent pas de tirer des conclusions valables sur le plan quantitatif ou d'effectuer des comparaisons entre les diverses expériences.

Pour exploiter pleinement les résultats, il est indispensable de recourir à une méthode statique qui permet d'une part de tracer la courbe la plus vraisemblable et d'autre part d'évaluer le degré de signification du test.

Pour caractériser l'efficacité d'une intensité d'un stimulus (la dose du produit) on peut choisir un effet standard, par exemple la dose efficace minimale, et la dose efficace maximale, mais ces deux doses représentent mal la population car elles sont situées aux extrémités de la courbe.

J. Revan, en 1927 [51], a proposé comme critère la dose efficace moyenne qui est celle qui varie le moins d'un échantillon à l'autre et qui représente le plus grand nombre de cas dans une population. C'est la DE50 : c'est-à-dire la dose qui produit une réponse dans la moitié de la population.

La DE50 est équivalente à la DL50 (cette dernière est la plus utilisée), qui est la dose nécessaire et suffisante pour tuer la moitié d'une population.

On peut aussi se servir de la DL90 qui est la dose nécessaire et suffisante pour tuer 90% de la population. La DL90 est utile pour caractériser les pesticides dont la vocation est de se débarrasser au mieux des déprédateurs.

Afin de déterminer cette DL50, il nous faut tracer les droites de régressions. Les valeurs des pourcentages de mortalité sont transformées en Probits, et on trace ces nouvelles valeurs en fonction du logarithme népérien des doses 50% de la mortalité correspond à la valeur 5 en Probits, de là on en tire la DL50.

Le tableau IV donne la transformation des pourcentages de mortalité en probits.

**Tableau IV :** Transformation des pourcentages de mortalité en probits

%	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
	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,75	7,75	7,88	8,09

On procède par interpolation linéaire lorsque l'on doit déterminer des valeurs situées entre celles données dans la table.

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

# **CHAPITRE V**

## **EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DU ROMARIN ET DU THYM**



# V

## EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE DU ROMARIN ET DU THYM

Une huile essentielle est un extrait odorant d'origine végétale obtenu soit par entraînement à la vapeur d'eau ou hydrodistillation, soit par expression.

Pour des raisons économiques, et de facilité et même du fait que les huiles essentielles reconnues par les normes commerciales sont extraites par entraînement à la vapeur et par hydrodistillation, nous nous proposons d'étudier ces deux techniques, et de déterminer la composition chimique pour chaque huile essentielle.

### **I. Entraînement à la vapeur d'eau.**

La distillation à la vapeur d'eau est le plus ancien des procédés d'extraction des huiles essentielles à partir des végétaux. Il est basé sur le fait que la plupart des composés odorants volatils sont susceptibles d'être entraînés par des aérosols de vapeur d'eau du fait de leur point d'ébullition relativement bas et leur caractère hydrophobe [34].

Sa mise en œuvre facile et l'utilisation de la vapeur d'eau disponible et à bas prix, comptent parmi ses avantages. Cependant, il faut tenir compte du fait que la température de la vapeur d'eau varie au cours de l'entraînement de l'huile. Elle est basse au début du processus et la vapeur ne peut entraîner que les constituants très volatils ; ensuite elle augmente graduellement et les constituants à points d'ébullition élevés sont entraînés. Ainsi, la composition de l'huile obtenue en fin de processus est différente de celle obtenue au début.

Par ailleurs, pendant l'entraînement à la vapeur d'eau, la matière végétale est exposée à une température élevée et à l'action chimique de l'eau, et dans ces conditions la fragilité thermique des constituants de l'huile ou la formation

d'artefacts ainsi que la difficulté d'extraire les produits odorants peu volatils ou ceux appréciablement solubles dans l'eau sont les plus importants inconvénients de ce procédé.

## **II. L'hydrodistillation.**

L'hydrodistillation est basée sur le même principe que l'entraînement à la vapeur d'eau. La seule différence est que dans le cas de l'hydrodistillation la matière végétale est en contact direct avec l'eau ou est complètement immergée selon sa densité et la quantité à traiter. La vapeur formée au sein de l'eau bouillante entraîne l'huile essentielle.

## **III. Matériels et méthodes.**

### **III.1. Entraînement à la vapeur d'eau.**

L'entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle laboratoire a été réalisé à l'aide du dispositif expérimental schématisé par la figure 8. Celui-ci comprend un ballon d'une capacité de 2 litres servant à produire la vapeur d'eau. Ce ballon est surmonté d'une colonne en verre contenant la matière végétale et reliée à un réfrigérant. Le distillat est récupéré dans un ballon de recette.

L'étape suivante consiste à séparer l'huile essentielle de l'eau. Pour cela une extraction à l'éther diéthylique est réalisée. L'huile essentielle est ensuite récupérée après évaporation à l'air libre de l'éther.

### **III.2 Hydrodistillation.**

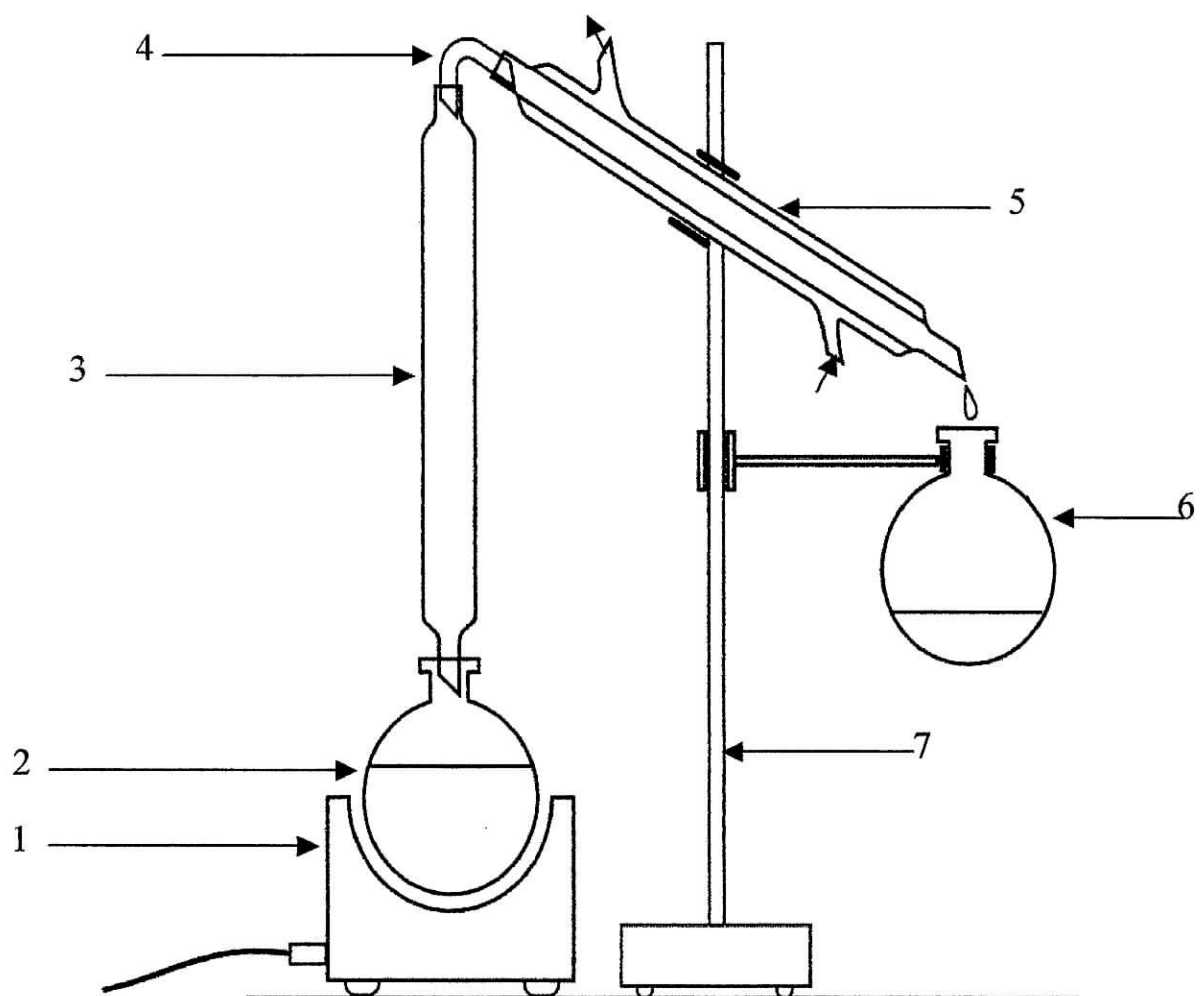
L'hydrodistillation à l'échelle laboratoire a été réalisée à l'aide du dispositif expérimental schématisé par la figure 9. Celui-ci comprend un ballon d'une capacité de 4 litres contenant l'eau bouillante. Ce ballon est relié à un réfrigérant qui sert à condenser la vapeur d'eau contenant l'huile essentielle extraite. Le distillat est récupéré dans un ballon de recette.

L'huile est récupérée de la même manière que pour l'entraînement à la vapeur d'eau.

Le romarin utilisé pour les essais d'extraction provient de l'Institut National d'Agronomie (INA). Il a été cueilli en période de floraison et séché à l'air libre et à l'abri de la lumière.

Le thym utilisé a été acheté sur le marché local. Il proviendrait probablement du Sahara algérien.

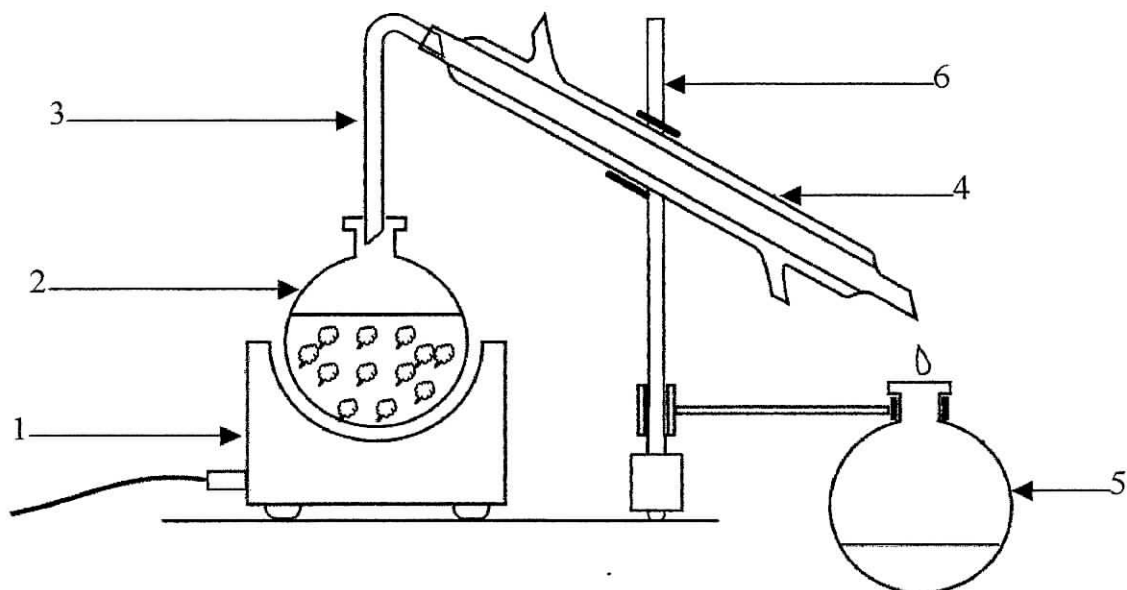
Les deux plantes ont été identifiées à l'herbier de l'INA comme étant *Rosmarinus officinalis*. L pour le romarin et *Thymus fontanesii* pour le thym.



1 : chauffe ballon  
2 : Ballon  
3 : Colonne (matière végétale)  
4 : Coude

5 : réfrigérant  
6 : Ballon de recette  
7 : Statif

**Figure 8** : Dispositif de l'extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau



1 : chauffe ballon  
2 : Ballon

3 : Coude  
4 : réfrigérant

5 : Ballon de recette  
6 : Statif

**Figure 9** : dispositif expérimental de l'hydrotistillation de l'huile essentielle.

#### IV. Conditions opératoires.

Les essais d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur et hydrodistillation ont été réalisés dans les conditions suivantes :

La masse de matière végétale : 50 g  
Le débit moyen du distillat : 9.5 ml/mn  
La durée de l'extraction : 2 heures

## V. Calcul du rendement.

Le rendement en huile essentielle a été calculé en utilisant la relation suivante :

$$R_{HE} = (m_{HE} / m_{mv}) \times 100$$

Où :

$R_{HE}$  : Le rendement en huile essentielle (%)

$m_{HE}$  : la masse d'huile essentielle (g)

$m_{mv}$  : la masse de matière végétale utilisée (g)

## VI. Résultats et discussion.

### VI.1. Rendement en huile essentielle.

Après une durée d'extraction de deux heures par entraînement à la vapeur et hydrotistillation, les rendements en huiles essentielles obtenus à partir des deux végétaux étudiés sont reportés dans le tableau V.

**Tableau V** : Rendement en huiles essentielles

	Entraînement à la vapeur d'eau	Hydrodistillation
Rendement en H.E de romarin (%)	1,45 – 1,68	0.50
Rendement en H.E de thym (%)	1.85 – 2,24	1.11

L'examen de ce tableau nous permet de tirer les conclusions suivantes :

- Les valeurs de rendement obtenus pour le romarin sont comparables à celle rapportées dans la littérature (le tableau VIII).
- Le thym donne de meilleurs rendement que le romarin.
- L'entraînement à la vapeur donne de meilleurs rendements que l'hydrodistillation pour les deux plantes. Les valeurs des rendements plus faible pour l'hydrodistillation pourraient s'expliquer par le fait qu'une partie de l'huile s'est solubilisée dans l'eau.

Dans le tableau VI nous reportons les rendements des huiles essentielles de romarin des différentes origines.

**Tableau VI** : Rendement en huile essentielle de romarin de certains pays [52]

Origine	Rendement
Brésil	2,5
Turquie	2,3
Algérie	1,5
Espagne	1,1
Hongrie	0,9
Russie	0,3
Egypte	0,1 – 0,4

## VI.2. Etude de la cinétique d'extraction.

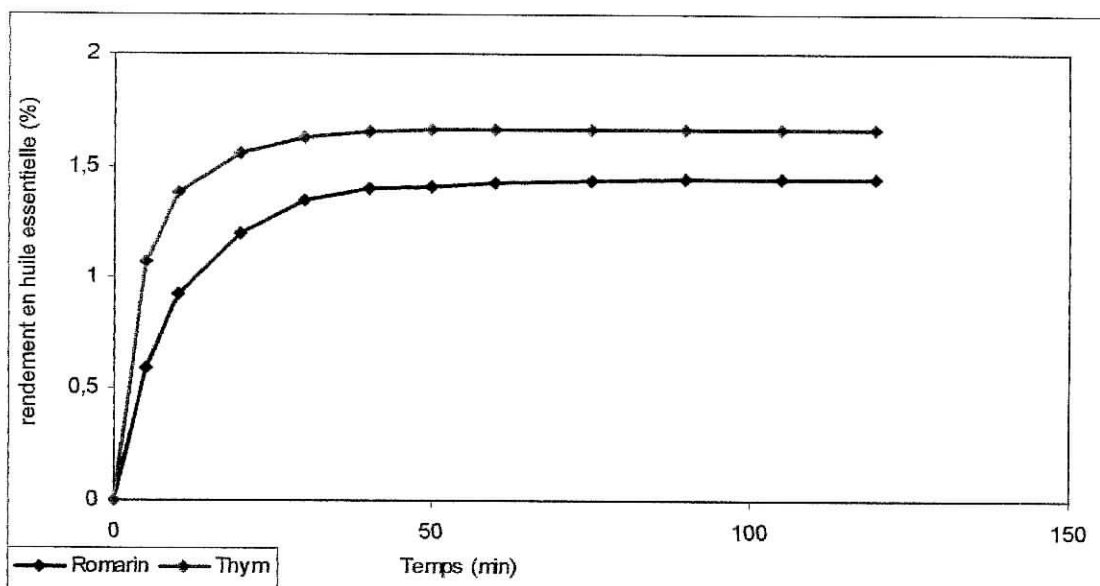
Afin d'étudier les cinétiques d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation des huiles essentielles de nos deux plantes (romarin et thym) des essais ont été réalisés dans les conditions précédemment citées. L'huile essentielle a été récupérée à des intervalles de temps réguliers.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau VII suivant :

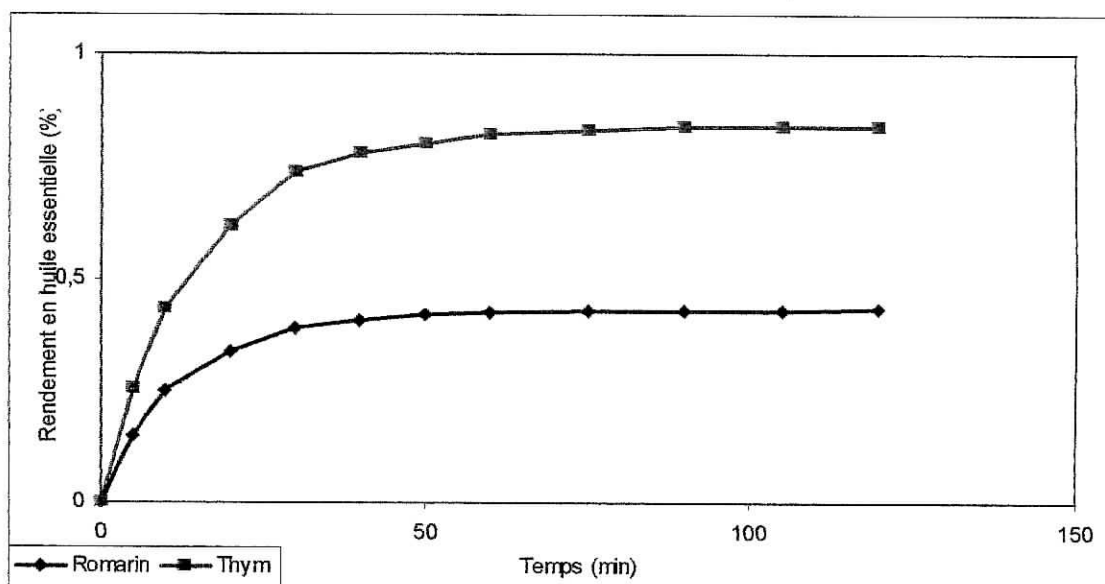
**Tableau VII** : Résultats de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle de romarin et de thym par entraînement à la vapeur et par hydrodistillation

Temps (min)	Rendement en huile essentielle (%)			
	Entraînement à la vapeur d'eau		Hydrodistillation	
	Romarin	Thym	Romarin	Thym
0	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.592	1.068	0.150	0.257
10	0.922	1.387	0.250	0.435
20	1.200	1.561	0.338	0.615
30	1.350	1.635	0.390	0.735
40	1.401	1.662	0.408	0.778
50	1.414	1.664	0.418	0.799
60	1.430	1.666	0.425	0.821
75	1.440	1.667	0.428	0.833
90	1.445	1.668	0.429	0.839
105	1.449	1.669	0.430	0.840
120	1.450	1.670	0.431	0.841

Les figures 10, 11 représentent l'évolution au cours du temps du rendement en huile essentielle de romarin et de thym pour l'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation.



**Figure 10 :** Evolution au cours du temps du rendement en huile essentielle « Entraînement à la vapeur d'eau »



**Figure 11 :** Evolution au cours du temps du rendement en huile essentielle « Hydrodistillation »

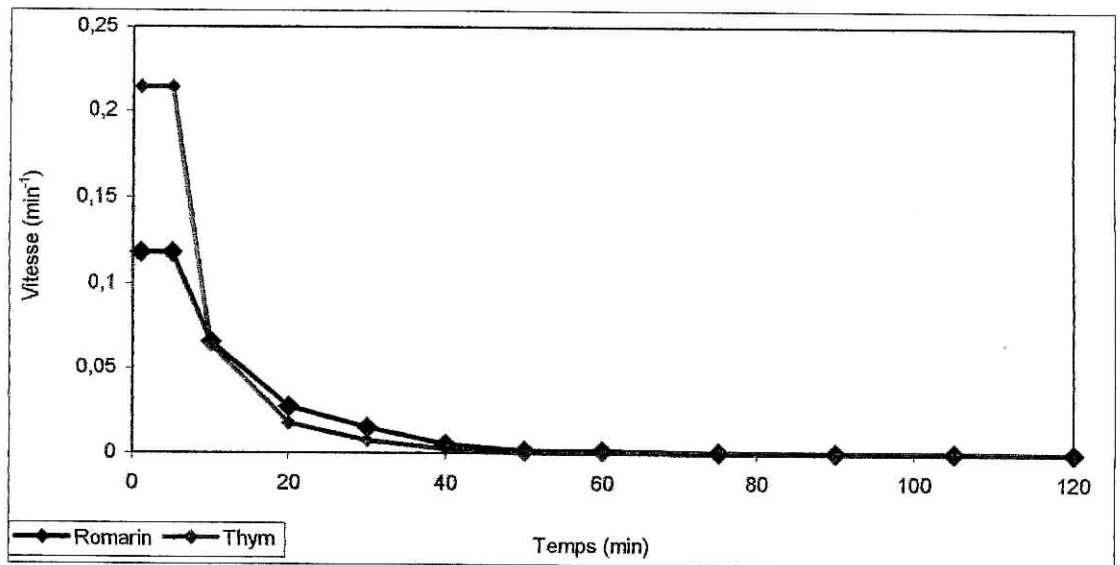
L'examen de la figure 10 qui représente l'évolution de la quantité des huiles essentielles du romarin et du thym au cours de l'entraînement à la vapeur d'eau montre des courbes de même allure. En effet, on remarque une augmentation rapide du rendement au début de l'extraction, elle est plus lente par la suite. Ces courbes peuvent être divisées en deux périodes. La première est très rapide, surtout pour le thym. Il donne un rendement pendant les cinq premières minutes presque équivalent à ce que donne le romarin en quinze minutes du début de l'extraction. La deuxième période est caractérisée par un ralentissement de l'extraction.



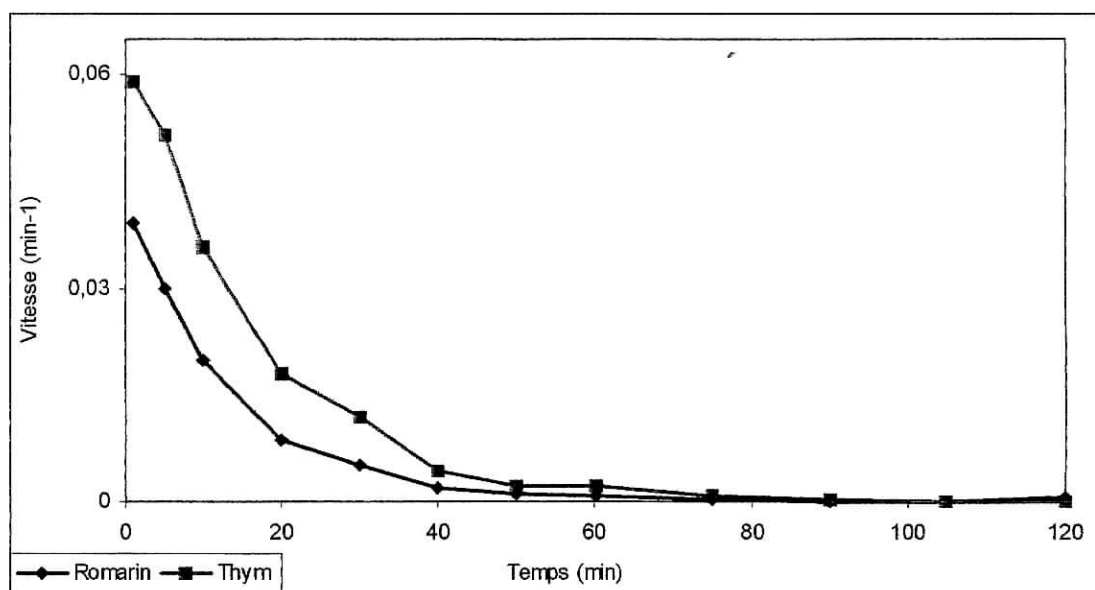
L'augmentation du rendement au début du processus serait probablement due à l'extraction de l'huile essentielle superficielle. La récupération de l'huile emmagasinée dans des sites internes serait la cause du ralentissement du processus d'extraction par la suite. De telles observations ont été signalées pour le romarin [28].

Pour l'hydrodistillation, les courbes obtenus, représentées à la figure 11, ont aussi la même allure. La seule différence est que l'évolution du rendement au début du processus est moins rapide que pour l'extraction à la vapeur d'eau. Ce qui laisse supposer que les phénomènes intervenant sont différents.

Par ailleurs, les allures des courbes cinétique étant similaires pour un même procédé. On peut supposer que l'extraction des huiles essentielles fait intervenir les mêmes phénomènes pour les deux plantes étudiées.



**Figure 12 :** Evolution au cours du temps de la vitesse d'extraction par entraînement à la vapeur



**Figure 13 :** Evolution au cours du temps de la vitesse d'extraction par hydrodistillation

La représentation des variations de la vitesse d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau, figure12 montre bien deux périodes, une première à vitesse constante et une seconde période à vitesse décroissante. Durant la première période; c'est l'huile superficielle qui est récupérée par simple évaporation. La deuxième période; correspond à l'extraction de l'huile interne par des phénomènes de diffusion. Concernant l'hydrodistillation, les variations de la vitesse d'extraction représentées à la figure13, montrent l'existence d'une seule période à vitesse décroissante. L'huile est récupérée dans ce cas par diffusion.

### VI.3. Propriétés organoleptiques et physiques.

Une étude bibliographique nous a permis de résumer les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de romarin et de thym. Elles sont données dans le tableau VIII.

Nous avons procédé à la détermination de la densité et l'indice de réfraction des huiles essentielles de romarin et de thym selon les méthodes normalisées [36].

Les résultats de l'analyse organoleptique et physique sont reportés dans le tableau IX.

**Tableau IX** : Caractéristiques organoleptique et physiques des huiles essentielles du romarin et du thym

Caractéristiques		Huiles essentielles	
		Romarin	Thym
Organoleptiques	Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile
	Couleur	Jaune pâle	Orangée
	Odeur	Camphrée	Epicée
Physiques	Densité	0.894	0.927
	Indice de réfraction	1.466	1.510

Ces résultats sont en accord avec ceux cités dans la littérature (tableau VIII)

#### VI.4. Composition chimique des huiles essentielles.

##### VI.4.1. Composition chimique de l'huile essentielle de romarin.

L'huile essentielle de romarin obtenue par entraînement à la vapeur a été analysée par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Les conditions opératoires d'analyse sont les suivantes :

- **Colonne :**

Phase stationnaire : D.B.5

Nature : silice fondue

Longueur : 30 m

diamètre intérieur : 0,3 mm

Épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$

- **Température**

Colonne : 50°C à 230°C à raison de 2°C/min

Injecteur : 250°C

Détecteur : 250°C

- **Gaz vecteur** : hélium 1 ml/min

- **Volume injecté** : 0,1  $\mu\text{l}$

L'identification des constituants de l'huile essentielle de romarin obtenue par entraînement à la vapeur d'eau s'est faite par comparaison des temps de rétention et des surfaces calculées à ceux des étalons de référence.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau X.

**Tableau X :** Composition chimique de l'huile essentielle de romarin

constituant	Teneur relative (%)
Camphene	0,86
2,4(10)-thujodien	0,12
benzaldehyde	0,01
sabinene	0,03
2- $\beta$ pinene	0,83
1-octen-3-ol	0,02
$\beta$ -myrcene	0,73
$\alpha$ -phéllandrene	0,14
inconnu	0,05
$\alpha$ -terpinene	0,42
p-cymene	2,20
dI-limonene	3,93
1,8 cinéol	0,14
$\gamma$ -terpinene	1,94
hydrate de sabinene	0,50
fenchone	0,05
$\alpha$ -terpinolene	1,44
linalol	5,37
nonanol	trace
fenchol	0,26
chrysanthenone	0,92
$\alpha$ -camphelenol	1,63
camphre	12,88
cis-verbenol	0,77
pinocarvone	2,61
inconnu	1,27
borneol	3,53
camphénol	0,21
inconnu	0,45
$\gamma$ -campholenol	0,49
4-terpineol	1,68
$\alpha$ -terpineol	1,83
cuminol	0,16
myrtenol	0,34
verbenone	14,85
carveol	0,85

methylcamphenoate	0,07
inconnu	0,15
geraniol	0,60
p-mentha-1,8-dien-3-one	0,12
Acétate de bornyle	3,54
thymol	0,20
carvacrol	0,17
inconnu	0,54
piperitenone	0,13
eugenol	0,06
Acetate d'isopulegyl	0,08
$\alpha$ -copaene	0,01
$\beta$ -caryophyllene	14,77
$\alpha$ -bergamotene	0,34
$\alpha$ -caryophyllene	5,84
$\beta$ -farnesene	0,47
trans geranylacetone	0,20
$\beta$ -himachalene	0,34
inconnu	0,06
zingibrene	0,31
$\beta$ -bisobolone	4,84
$\beta$ -sesquiphellandrene	0,72
Oxyde de caryophyllene	1,09
inconnu	0,25
methyl jasmonate	0,20
Epoxyde	0,24
d'isoaromadendrene	
$\alpha$ -bisobolool	0,37
Cis-lanceol	0,15
nerolidol	0,02
Acide hexadecanoide	0,03

L'analyse de l'huile essentielle de romarin par chromatographie en phase gazeuse à permis d'identifier 67 constituants. La verbenone et le  $\beta$ -caryophyllene sont les constituants majoritaire avec 14,85 % et 14,77 % respectivement suivis du camphre avec 12,88 %, le  $\alpha$ -caryophyllène avec 5,84 % et le linalol avec 5,37 %.

### VI.4.2. Composition chimique de l'huile essentielle de thym.

L'huile essentielle de thym a été analysé par spectrométrie de masse à l'aide d'un instrument HP type 5870.

Les conditions opératoires d'analyse sont les suivantes :

- **Colonne :**

Phase stationnaire : D.B.1.

Longueur : 30 m.

Diamètre intérieur : 0,23 mm

Epaisseur du film : 0,1  $\mu$ m

- **Température**

Colonne : palier de 3 minutes à 60°C puis 60°C à 200°C à raison de 5°C/mn

Injecteur : 220°C

Détecteur : 270°C

Gaz vecteur : hélium : 0,9 ml/min

volume injecté : 0,1  $\mu$ l

L'identification des constituants de l'huile essentielle de thym s'est faite par comparaison des données chromatographiques et spectrales avec celles de la littérature.

Les résultats obtenus sont données dans le tableau XI.

**Tableau XI** : Composition chimique de l'huile essentielle de thym.

Constituant	Teneur relative (%)
$\alpha$ -pinene	0.3
Octen-3-ol	0.9
Myrcene	0.7
$\alpha$ -terpinene	0,9
p-cymene	9.7
Limonene	0.2
1,8-cineole	0.1
$\gamma$ -terpinene	7.3
Linalol	1.2
Borneol	0.2
Terpinen-4-ol	0.4
p-cymen-8-ol	0.1
$\alpha$ -terpineol	0.5
O-methylthymol	0.3
Thymoquinone	0.1
O-methylcarvacrol	0.4
Thymol	26.4
Carvacrol	44.1
$\beta$ -caryophyllene	2.5
$\alpha$ -humulene	0.1
$\beta$ -bisabolene	1.7
Sesquisabinene	0.5
(Z)- $\alpha$ -bisabolene	0.8
Caryophyllene oxyde	0.6

L'analyse de l'huile essentielle de thym par spectrométrie de masse a permis d'identifier 24 constituants. Le carvacrol est le constituant majoritaire avec 44,1% suivi par le thymol avec 26,4%, le p-cymène avec 9,7 % et le  $\gamma$ -terpinène avec 7,3 %.

**Tableau VIII :** Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de de romarin et de thym [51]

Nature de l'huile essentielle	Nom botanique (famille végétale)	Organe Végétal traité	Mode de traitement et rendement	Aspect	Principaux constituants chimiques
Huile essentielle de romarin	Romarinus officinalis L. (Lamiaceae) Autres variétés et forme : genuira, rigidus, angustifolius, etc	Rameau (tige et feuille) partiellement haché	Entraînement à la vapeur d'eau dans des alambics chauffés à feu nu ou dans des installations industrielles Durée : 3 à 4h Rendement variable selon le lieu de production, la saison et l'état de fraîcheur du végétal. En Espagne, le rendement est de 0,75% en été et de 0,435% en hiver. En Dalmatie, le rendement est de 1,5%. Au Maroc et en Tunisie, il est de 0,3 à 0,5%.	Liquide mobile, limpide, presque incolore à jaune pâle Odeur caractéristique fraîche. Plus ou moins camphrée selon l'origine de la plante.  L'huile essentielle espagnole possède une couleur qui va du jaune pale au vert jaunâtre.	Hydrocarbures monoterpéniques : $\alpha$ -pépine, sabinène, camphène, $\beta$ -pinène, sabinène, terpinolène; 1,8-cinéole (17 à 32%); $\alpha$ et $\beta$ -thuyones (<0,5%); camphre; linalol et acétate de linalyle; $\beta$ -caryophyllène; terpin-1-4-ol, $\alpha$ -terpinéol, bornéol; verbénone, camphrol (17%), acétate de bornyle (2 à 7%).
Huile essentielle de thym	Thymus vulgaris L. Chémotype thymol et thymus zygis L. (Lamiaceae)	Tige feuillée de thymus vulgaris et de thymus zygis	Entraînement à la vapeur d'eau (hydrodistillation) dans des alambics chauffés à feu nu ou dans des installations industrielles Durée : 5 à 8h Rendement : 0,5 à 1,7% Moyenne : 1,1% Maximum : jusqu'à 2%	Liquide mobile. Couleur traditionnellement allant du brun au brun rouge. Odeur caractéristique aromatique, phénolique (thymol) avec un fond légèrement épicé.	Thymol (20 à 50%); carvacrol, $\alpha$ -thuyène; $\alpha$ et $\beta$ -pinène; myrcène; $\alpha$ et $\beta$ -terpène; cymène; linalol; trans-thuyon-4-ol; $\beta$ -caryophyllène; éther méthylique du carvacrol.



**Tableau VIII : caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de romarin et de thym (suite).**

Nature de l'huile essentielle	Lieux de production statistiques	Toxicité DL50	Emplois	Densité	Indice de réfraction	Pouvoir rotatoire	Solubilité dans l'éthanol dilué
Huile essentielle de Romarin	Pourtour Méditerranéen (Maroc, Tunisie, Espagne, sud de la France, Portugal) production mondiale en 1984 : 2051 Espagne : 130 t Maroc : 60 t Tunisie : 50 t	Oracle chez le rat : 5 ml/kg Dermique chez le lapin : >10ml/kg	Parfumage des savons, des détergeants , des poudres à laver. Emplois dans les arômes alimentaires (viandes, sauces, potages) et les préparations pharmaceutiques comme ingrédients dans les linéaments rubéfiants (médicaments).	Huile française			
				0,895 à 0,916	1,4670 à 1,4740	-1° à +16°	1 volumes d'éthanol à 80%
				Huile de Tunisie et du Maroc			
				0,908 à 0,920	1,4670 à 1,4740	-1° à +6°	1 volume d'éthanol à 80%
				Huile du Portugal			
				0,860 à 0,880	1,4660 à 1,4750	+4° à +25°	<20 volumes d'éthanol à 80%
				Huile d'Espagne			
0.895 à 0,910	1,4670 à 1,4740	-3° à +10°	<20 volumes d'éthanol à 80%				
Huile toutes origines							
0,894 à 0,912	1,4640 à 1,4760	-5° à +10°	1 volume d'éthanol à 90% turbidité à la dilution				
Huile essentielle de Thym	Espagne (provinces de Murcie, d'Almeira, de grenade) ; Maroc , Israrel Ex-yougoslavie ; Portugal ; sud de la France Production en 1984 : 25t dont 90% pour l'Espagne	Oracle chez le rat : 4,7g/kg Dermique chez lr lapin : > 5g/kg	Pouvoir germicide utilisé comme désinfectant et antiseptique and les préparations pharmaceutiques aromatisation des aliments : viandes, sauces, conserves, condiments,... ; parfumage des savons.	0,915 à 0,935  0,910 à 0,935	1,4960 à 1,5050  1,4950 à 1,5050	Le plus souvent impossible à mesurer, légèrement lévogyre.	2 volumes d'éthanol à 90%  10 volumes d'éthanol à 80% avec légère opalescence ou turbidité

# **CHAPITRE VI**

## **EVALUATION DE LA TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES SUR *RHYZOPERTHA DOMINICA***

# **VI**

## **EVALUATION DE LA TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES SUR *RHYZOPERTHA DOMINICA***

L'utilisation de pesticides pendant plusieurs années a entraîné de nombreux problèmes, entre autre le développement du phénomène de résistance chez les insectes, la phytotoxicité, les déséquilibres biologiques des écosystèmes et la présence de résidus sur les denrées stockées. Cette situation a suscité depuis quelques années l'orientation de la recherche vers les produits naturels issus de plantes comme une alternative pour lutter contre les ravageurs des denrées stockées.

L'objectif de notre travail est de vérifier si les huiles essentielles extraites du romarin et du thym possèdent un effet insecticide sur *Rhyzopertha Dominica*, insecte ravageur des denrées stockés.

### **I. Matériels et méthodes.**

#### **I.1. Matériel entomologique.**

*Rhyzopertha Dominica* provient d'un élevage de masse réalisé au laboratoire dans une étuve réglée à  $(33 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  et une humidité relative de  $(60 \pm 5)\%$ . Les insectes sont élevés sur du blé tendre variété HD 1220, les adultes utilisés pour nos expériences sont âgés de 3 à 5 semaines.

#### **I.2. Huiles essentielles.**

Les huiles essentielles ont été extraites par entraînement à la vapeur d'eau des feuilles de romarin et de thym. Des solutions d'huiles essentielles de différentes

concentrations dans un solvant sont utilisées pour les différents tests de toxicité. Le solvant utilisé est l'acétone.

## **II. Méthodologie.**

### **II.1. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles par contact.**

Des papiers filtres de 9 cm de diamètre sont imprégnés avec 0,83 ml d'une solution d'huile essentielle d'une concentration donnée (tableau XII). Pour le témoin, on utilise du solvant pur.

Après séchage, 30 insectes sont déposés sur le papier filtre dans une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre et 1,5 cm de hauteur. Les boîtes de Pétri sont recouvertes avec de la moustiquaire pour éviter la fuite des insectes.

Après 24h d'exposition aux huiles essentielles, les insectes sont transférés dans des boîtes contenant 10g de blé non traité et placé dans l'étuve. La mortalité des insectes est évaluée 6 jours après traitement.

Cinq répétitions sont réalisées pour chaque concentration et pour le témoin.

### **II.2. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles par inhalation.**

Des papiers filtres de 3 cm de diamètre sont imprégnés de 0.06 ml de solution d'huile essentielle de concentration donnée et placés dans le couvercle d'un pot à vis de 43,96 cm<sup>3</sup> de volume. Pour le témoin on utilise le solvant pur.

Après évaporation du solvant, le couvercle est vissé hermétiquement sur le flacon qui contient 30 insectes.

Après 24h d'exposition, les insectes sont transférés dans des flacons contenant 10g de blé non traité. Cinq répétitions sont réalisées pour chaque concentration d'huile essentielle et pour le solvant pur. La mortalité des insectes est évaluée 6 jours après le traitement.

### **II.3. Evaluation de la persistance d'action des deux huiles essentielles.**

La rémanence est la durée pendant laquelle les effets d'un traitement restent perceptibles [53].

Pour cette étude, 500g de blé tendre variété HD1220 sont arrosés avec 17,5 ml de solution d'huile essentielle de concentration égale à la DL50 évaluée pour l'essai contact. De même que pour le romarin et le thym nous avons utilisé 17,5 ml d'acétone pour le témoin.

Après mélange et évaporation du solvant, 80 g du blé traité est répartie dans les boîtes de Pétri.

Le nombre de répétition retenu est de quatre à raison de 50 insectes par répétition.

Pour tester la rémanence, les insectes sont exposés aux huiles essentielles juste après la traitement, une semaine, deux semaines après traitement. Pour chaque temps la mortalité est évaluée 7 jours après traitement.

#### **II.4. Evaluation de l'activité répulsive des huiles essentielles.**

Quatre cercles de papiers filtre de 9 cm de diamètre sont coupés en deux; et sont trempés dans la solution d'huile essentielle de concentration 0,346 mg/cm<sup>2</sup> pendant une minute. Après séchage à l'air libre pendant dix minutes, chaque demi cercle de papier filtre traité est attaché à un demi-cercle de papier filtre traité à l'acétone par une bande adhésive.

Chaque répétition (boîte Pétri) reçoit un papier filtre sur lequel sont déposés 30 insectes. Nous avons réalisé quatre répétitions pour chaque huile essentielle.

Les insectes présents sur chaque demi-cercle sont comptés 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures, 5 heures après traitement.

La moyenne obtenue est transformée en pourcentage de répulsivité selon la formule de Talukder et Howse (1993) [54].

$$PR = 2 \times (C - 50)$$

C : est le pourcentage d'insecte présent sur le demi-cercle de papier filtre non traité.

PR : est le pourcentage de répulsivité. Les valeurs positives expriment la répulsivité, et les valeurs négatives l'attractivité.

#### **II.5. Evaluation de la combinaison des deux huiles testées.**

Pour évaluer l'effet toxique du mélange du romarin et du thym, nous avons utilisé la DL50 de chaque huile. Trois essais ont été réalisés, un essai avec la DL50 du romarin, un autre avec la DL50 du thym, et un essai avec un mélange romarin-thym 50 / 50.

L'étude a porté aussi bien sur l'effet contact qu'inhalation. La méthodologie suivie est la même que celle utilisée pour les tests contact et inhalation.

**III. Résultats et interprétation.****III.1. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles par contact.**

L'efficacité d'un produit biocide est évaluée par la mortalité. Cependant, Le nombre d'individus dénombrés morts dans une population traitée par un toxique n'est pas le nombre réel d'individus tués par ce toxique. Il existe, en fait, dans toute population une mortalité naturelle qui vient s'ajouter à la mortalité provoquée par ce toxique. Les pourcentages de mortalités doivent être corrigés par La formule de *Shneider-Orelli* :

$$\%_M = \frac{M - M_t}{100 - M_t} \cdot 100$$

$\%_M$  : le pourcentage de mortalité corrigée (nouvelle variable).

M : le pourcentage de morts dans la population traitée.

$M_t$  : le pourcentage de morts dans la population témoin.

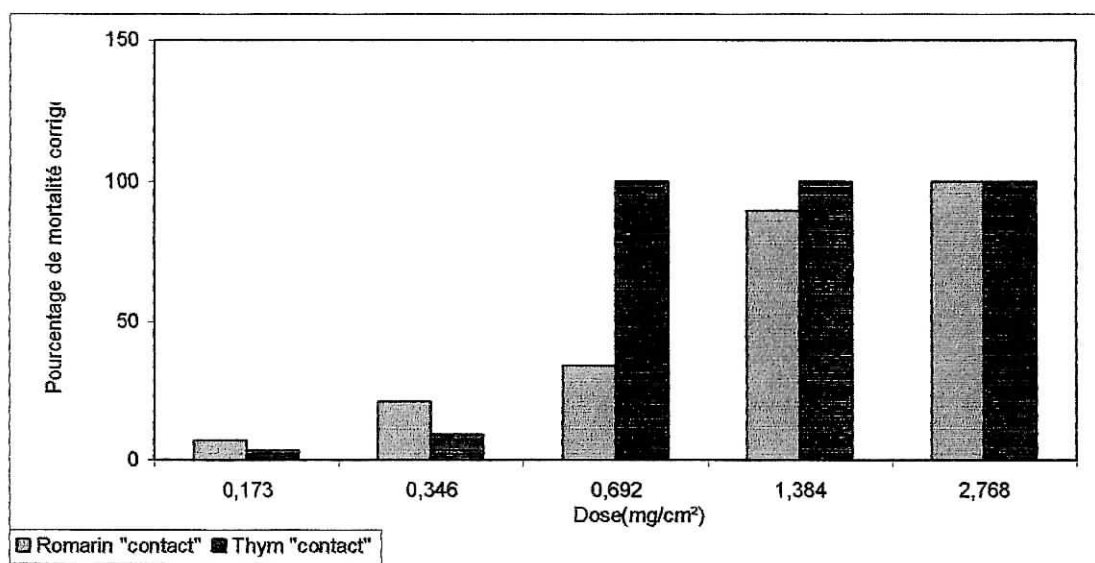
Les résultats obtenus sont enregistrés dans le tableau XII pour le romarin et XIII pour le thym.

**Tableau XII** : Mortalité par contact des insectes traités par le romarin

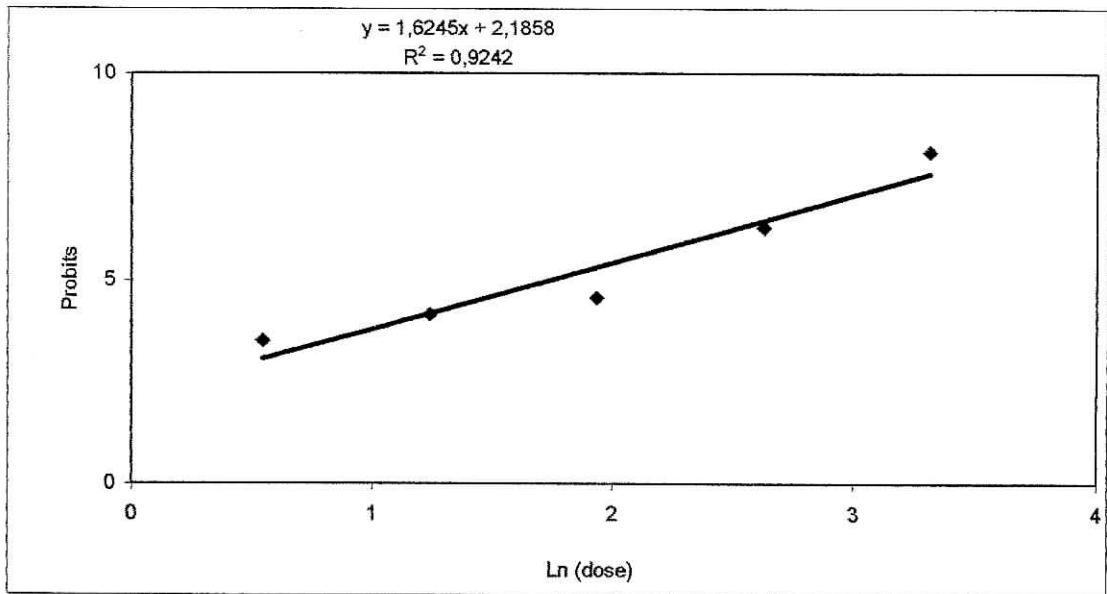
Dose d'HE (mg/cm <sup>2</sup> )	Mortalité					Somme	Moyenne	% de mortalité	% de mortalité corrigé
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>				
0,000	2	0	0	1	1	4	0,80	2,667	-
0,173	2	1	5	5	1	14	2,8	9,333	6,849
0,346	5	5	9	9	6	34	6,8	22,667	20,548
0,692	9	14	10	9	11	53	10,6	35,333	33,561
1,384	25	28	27	27	28	135	27,0	90,000	89,726
2,768	30	30	30	30	30	100	30,0	100,000	100,000

**Tableau XIII** : Mortalité par contact des insectes traités par le thym

Dose d'HE (mg/cm <sup>2</sup> )	Mortalité					Somme	Moyenne	% de mortalité	% de mortalité corrigé
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>				
0,000	2	0	0	1	1	4	0,8	2,667	-
0,173	2	2	2	1	2	9	1,8	6,000	3,424
0,346	5	3	2	1	6	17	3,4	11,333	8,903
0,692	30	30	30	30	30	150	30,0	100,000	100,000
1,384	30	30	30	30	30	150	30,0	100,000	100,000
2,768	30	30	30	30	30	150	30,0	100,000	100,000

**Figure 14** : Variation du pourcentage de mortalité corrigé des tests de toxicité par contact en fonction de la dose d'huile

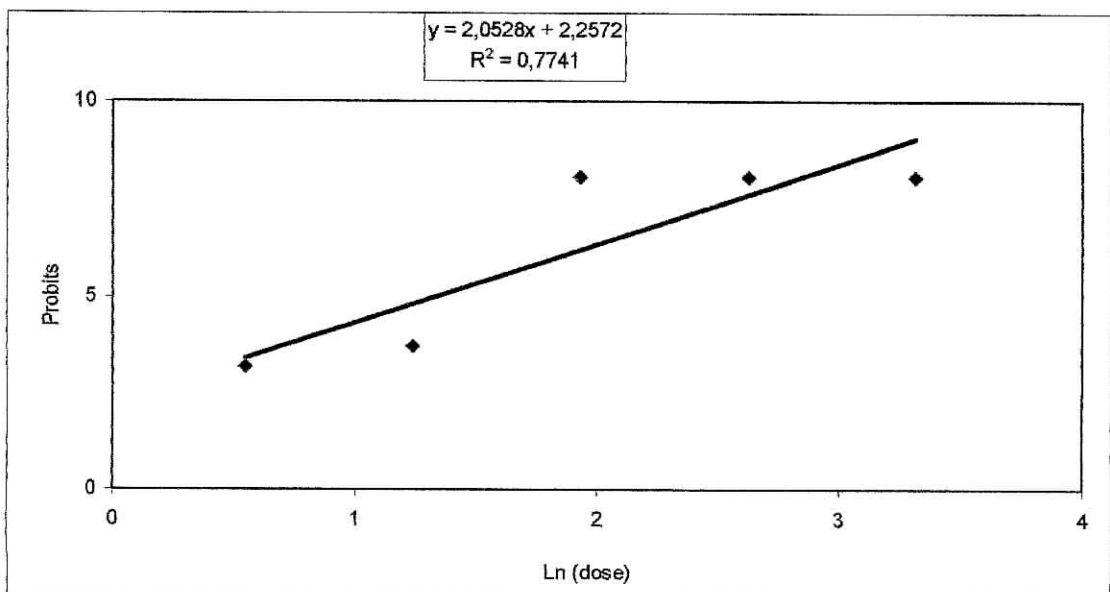
Les histogrammes donnant les variations du pourcentage de mortalité corrigé en fonction de la dose d'huile essentielle pour les tests de toxicité par contact représentés par la figure 14, montrent que la mortalité augmente avec la dose. Le pourcentage de mortalité varie de 9,33 % à 100 % pour le romarin et de 6 % à 100 % pour le thym. Notons par ailleurs que le thym se révèle plus efficace que le romarin puisque à la troisième dose, on observe 100 % de mortalité. Par contre le romarin révèle à la même dose une mortalité de 35,33 %. La détermination des DL50 et DL90 des deux huiles sont représentés par les figures 15 et 16.



**Figure 15 :** Détermination de la DL50 et DL90 de l'huile essentielle de romarin par contact

$$DL50 = 0,565 \text{ mg/cm}^2$$

$$DL90 = 1,243 \text{ mg/cm}^2$$



**Figure 16 :** Détermination de la DL50 et DL90 de l'huile essentielle de thym par contact



$$DL50 = 0,380 \text{ mg/cm}^2$$

$$DL90 = 0,709 \text{ mg/cm}^2$$

Si nous nous référons aux doses létales des huiles essentielles testées nous constatons que les DL50 et DL90 obtenues pour le thym sont nettement inférieures à celle enregistrées pour le romarin. Les résultats obtenus vont dans le même sens que ceux trouvés par S.Hamoudi 2002 [5] et montrent que les deux huiles essentielles possèdent une activité insecticide vis à vis de notre ravageur.

### III.2. Evaluation de la toxicité des huiles essentielles par inhalation.

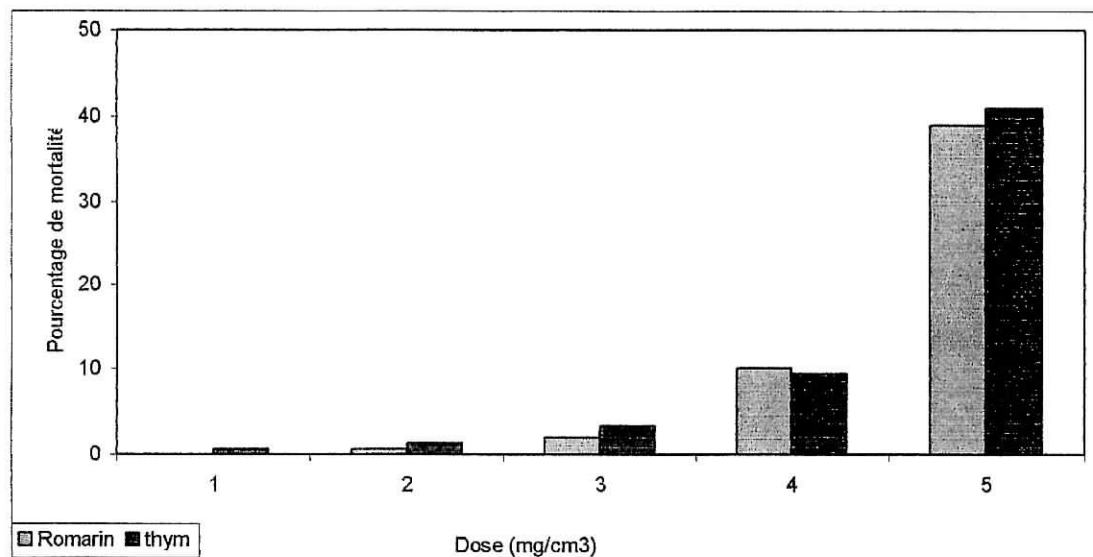
Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux XIV et XV pour et représentés à la figure 17

**Tableau XIV** : Mortalité par inhalation des insectes traités par le romarin

Dose d'HE (mg/cm <sup>3</sup> )	Mortalité					Somme	Moyenne	% de mortalité	% de mortalité corrigé
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>				
0,00	0	1	0	0	0	1	0,2	0,667	-
0,09	0	0	0	0	1	1	0,2	0,667	0
0,18	0	1	1	0	0	2	0,4	1,333	0,670
0,36	2	1	0	1	0	4	0,8	2,667	2,013
0,72	3	4	5	2	2	16	3,2	10,667	10,067
1,44	8	20	8	13	10	59	11,8	39,333	38,928

**Tableau XV** : Mortalité par inhalation des insectes traités par le thym

Dose d'HE (mg/cm <sup>3</sup> )	Mortalité					Somme	Moyenne	% de mortalité	% de mortalité corrigé
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>				
0,00	0	1	0	0	0	1	0,2	0,667	-
0,09	0	1	0	0	1	2	0,4	1,333	0,670
0,18	1	0	0	2	0	3	0,6	2,000	1,342
0,36	2	1	1	1	1	6	1,2	4,000	3,355
0,72	2	4	4	3	2	15	3,0	10,000	9,396
1,44	12	11	10	19	10	62	12,4	41,333	40,939

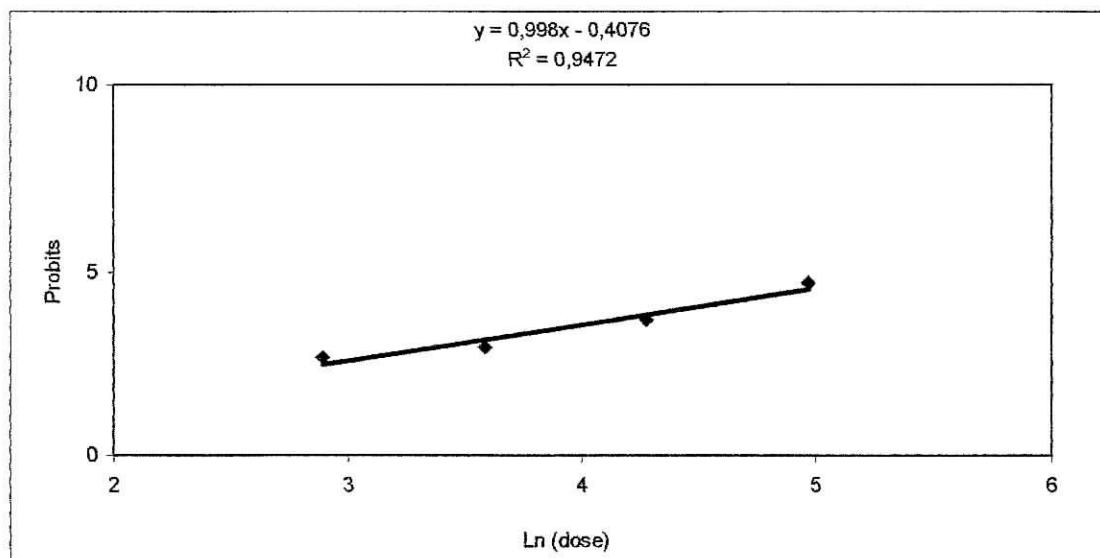


**Figure 17 :** Variation du pourcentage de mortalité corrigé des tests de toxicité par inhalation en fonction de la dose d'huile essentielle.

Nous constatons que le pourcentage de mortalité enregistré pour l'essai inhalation augmente avec la dose pour atteindre un optimum de 39,33 % pour le romarin et 41,33% pour le thym.

Nos résultats montrent que la mortalité par inhalation reste faible puisque nous n'atteignons pas 50% de mortalité quelques soit l'huile essentielle testée, Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par S.Hamoudi 2002 [5] lors d'une précédente étude sur *Rhyzopertha Dominica*. Cependant, Regnault-Roger G. et coll 1991 [2] en traitant *Acanthoscelides Obtectus* ont obtenu une mortalité de 100% pour le romarin et le thym aux doses respectives de 0,04 mg/cm<sup>3</sup> et 0,164 mg/cm<sup>3</sup>. Papachristos et coll 2002 [26] avaient aussi affirmé l'activité insecticide par inhalation pour le romarin.

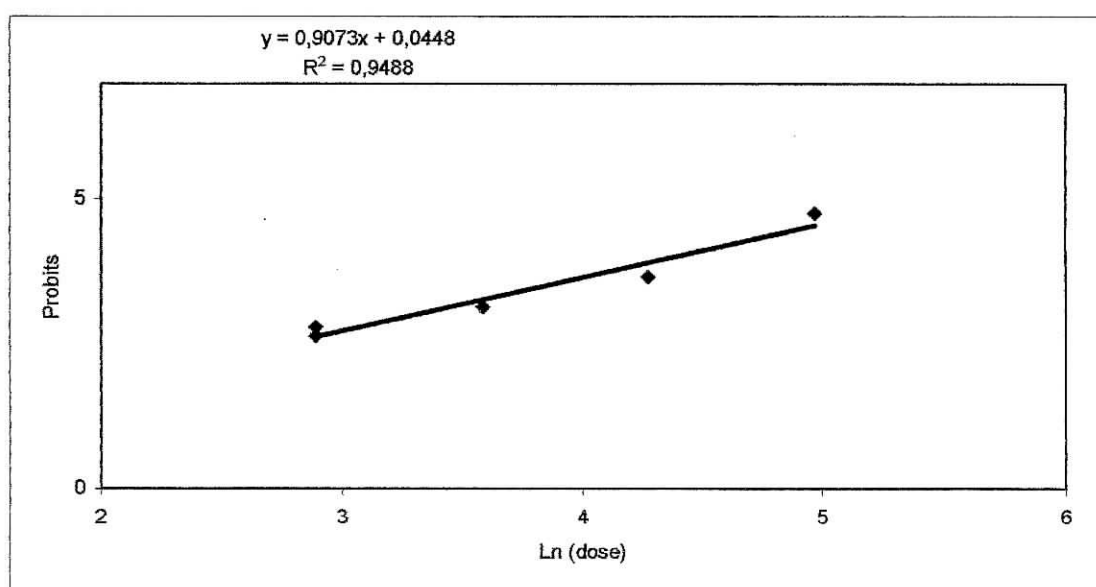
Les figures 18 et 19 représentent les droites de régression ayant permis de déterminer les DL50 et DL90 pour la toxicité par inhalation.



**Figure 18 :** Détermination de la DL50 et de la DL90 de l'huile essentielle de romarin pour la toxicité par inhalation.

$$DL50 = 2,255 \text{ mg/cm}^3$$

$$DL90 = 8,132 \text{ mg/cm}^3$$



**Figure 19 :** Détermination de la DL50 et de la DL90 de l'huile essentielle de thym pour la toxicité par inhalation.

$$DL50 = 2,354 \text{ mg/cm}^3$$

$$DL90 = 9,651 \text{ mg/cm}^3$$

Malgré la faible toxicité par inhalation des deux huiles, nous constatons que le romarin montre une plus grande efficacité ( $DL50 = 2,255$ ,  $DL90 = 8,132$ ) que le thym ( $DL50 = 2,354 \text{ mg/cm}^3$ ,  $DL90 = 9,651 \text{ mg/cm}^3$ ).

Donc le romarin et le thym possèdent une activité insecticide inhalatoire faible.

### III.3. Evaluation de la persistance d'action des huiles essentielles testées.

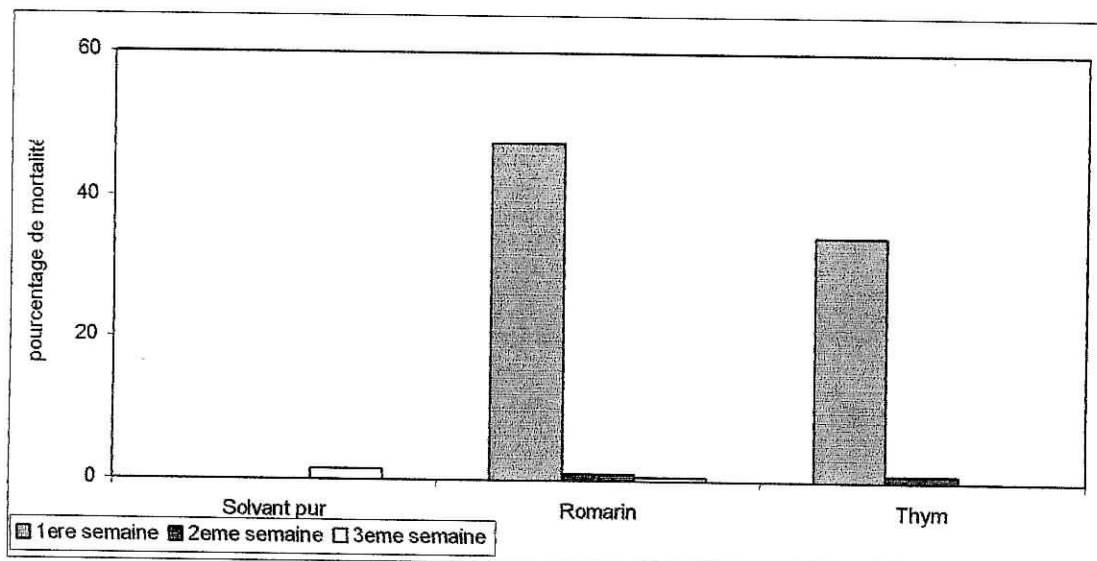
Les résultats obtenus pour la rémanence sont consignés dans le tableau XVI et représentés par la figure 20.

**Tableau XVI :** Evolution de la toxicité des huiles essentielles de romarin et de thym au cours du temps

Temps (semaine)	Solvant pur				Romarin				Thym			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	0	0	0	0	16	27	23	29	18	22	19	10
2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
3	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

**Tableau XVI :** Evolution de la toxicité des huiles essentielles de romarin et de thym au cours du temps (suite)

Temps (semaine)	%de mortalité solvant	%de mortalité romarin	%de mortalité thym
1	0	47,5	34,5
2	0	1,0	1
3	1,5	0,5	0



**Figure 20 :** variation du pourcentage de mortalité en fonction du temps

D'après la figure 20, nous remarquons que la mortalité diminue avec le temps. Au bout de la deuxième semaine la mortalité est insignifiante. Au bout de la troisième semaine l'effet insecticide est inexistant. Il semble donc que la durée d'action des deux huiles testées est limitée puisqu'elles ne sont plus toxiques au delà d'une semaine. Ceci laisse supposer que nos deux huiles sont biodégradables.

#### III.4. Evaluation de l'activité répulsive des huiles essentielles.

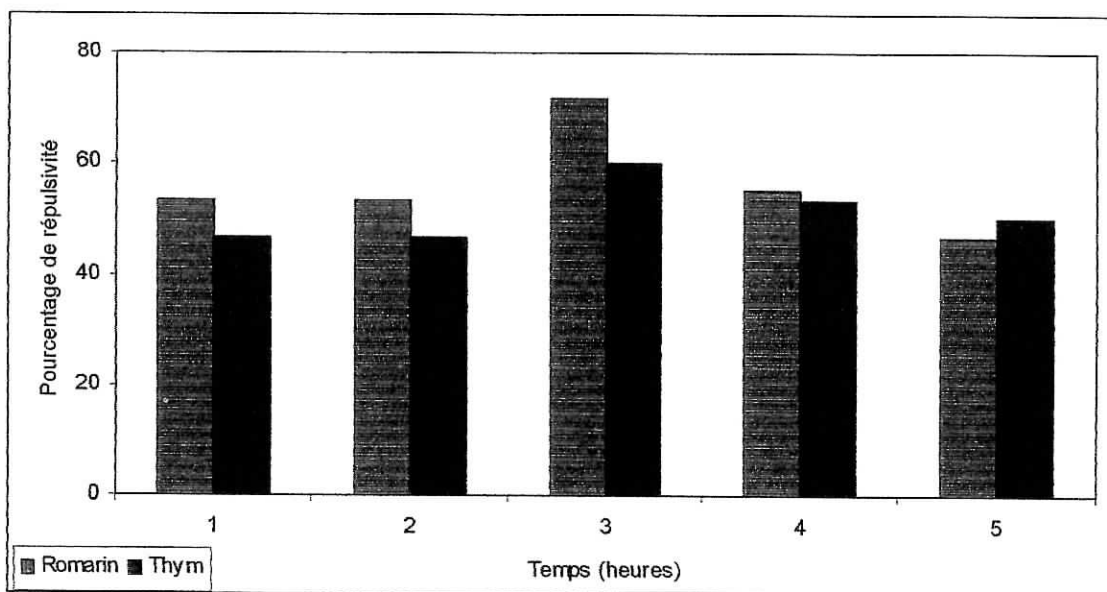
Les résultats obtenus figurent dans les tableaux XVII et XVIII et la figure 21

**Tableau XVII :** résultats des tests de l'activité répulsive de l'huile essentielle du romarin

Temps (heure)	Nombre d'insectes présent sur l'acétone				Somme	C (%)	% de répulsivité
	R1	R2	R3	R4			
1	28	17	25	22	92	76.667	+53.334
2	28	13	23	28	92	76.667	+53.334
3	30	21	27	25	103	85.833	+71.667
4	29	15	28	21	93	77.500	+55.000
5	22	20	21	25	88	73.333	+46.666

**Tableau XVIII** : résultats des tests de l'activité répulsive de l'huile essentielle de thym

Temps (heure)	Nombre d'insectes présent sur l'acétone				Somme	C (%)	% de répersivité
	R1	R2	R3	R4			
1	21	16	23	28	88	73.333	+46.666
2	21	16	23	28	88	73.333	+46.666
3	24	22	27	23	96	80.000	+60.000
4	22	23	26	21	92	76.667	+53.333
5	22	22	24	22	90	75.000	+50.000

**Figure 21** : variation du pourcentage de répersivité en fonction du temps

Les résultats obtenus (figure 21) montrent que les huiles essentielles manifestent une répulsivité vis à vis de *Rhyzopertha Dominica* puisque tous les pourcentages de répulsivité calculés sont positifs. Nous constatons que la répulsivité augmente avec le temps pour atteindre un optimum au bout de 3 heures pour les deux huiles, elle diminue par la suite.

Notons que le romarin montre une plus grande répulsivité (PR = 72 %) que le thym (PR = 60 %).

Nos résultats rejoignent ceux trouvés par Talukder et coll 1993 [54], Islam 1984 [55], et Islam 1985 [56].

### III.5. Evaluation de la combinaison des deux huiles essentielles.

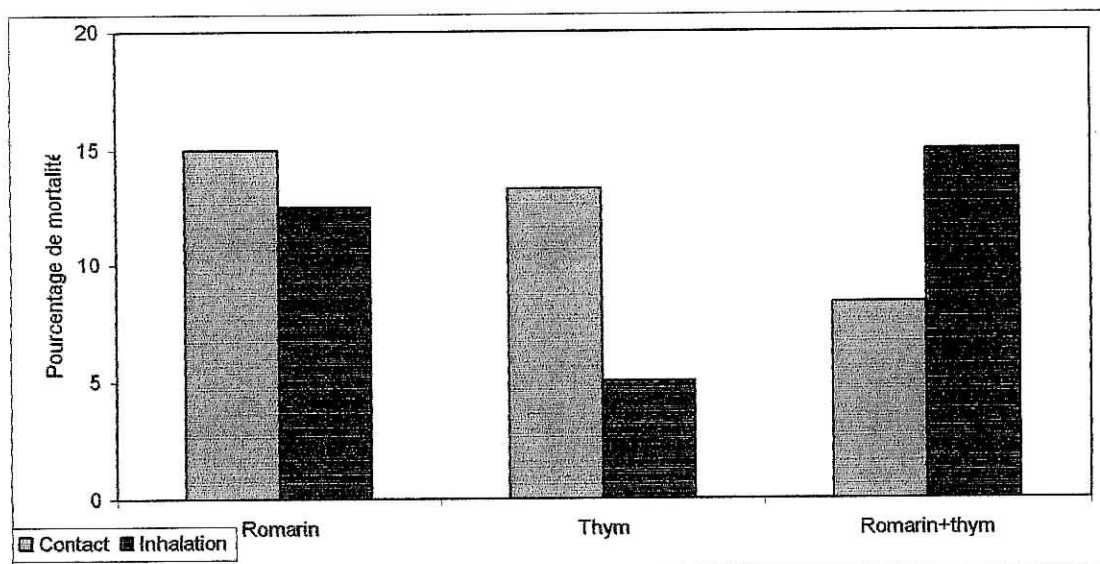
Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XIX et XX et représentés à la figure 22

**Tableau XIX** : Résultats des tests de toxicité par contact

	Mortalité				Somme	Moyenne	% de mortalité
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>			
Romarin	3	4	5	6	18	4,5	15,000
Thym	4	5	4	3	16	4,0	13,333
Romarin + thym	2	4	1	3	10	2,5	8,333

**Tableau XX** : Résultats des tests de toxicité par inhalation

	Mortalité				Somme	Moyenne	% de mortalité
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>			
Romarin	6	1	5	3	15	3,75	12,56
Thym	1	2	1	2	6	1,50	5,00
Romarin + thym	3	5	6	4	18	4,50	15,00



**Figure 22 :** Evolution de la mortalité des huiles essentielles et de leur mélange par contact et inhalation

Dans les conditions expérimentales retenues nous constatons que pour l'essai contact la mortalité obtenue pour le romarin et le thym est supérieure à la mortalité obtenue pour le mélange romarin-thym. Par contre pour l'inhalation nous constatons que la mortalité obtenue pour le mélange des deux huiles est supérieure à la mortalité provoquée par le thym et le romarin.

Ces essais préliminaires doivent être reconduits et approfondis pour avoir de plus amples renseignements en vue d'une formulation, puisque peu de travaux ont été réalisés dans ce domaine.



# **CONCLUSION GENERALE**

# CONCLUSION GENERALE

L'objectif visé par ce travail est d'extraire, analyser et évaluer la toxicité des huiles essentielles du romarin et du thym. Cette étude, nous a permis de constater que :

- Les rendements obtenus pour les deux plantes sont conformes aux données de la littérature.
- L'hydrodistillation des deux huiles essentielles a donné de faible rendement comparé a ceux obtenus par entraînement à la vapeur d'eau. Cette différence serait probablement due a une solubilisation partielle des huiles dans l'eau de distillation.
- L'étude des cinétiques d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation de l'huile essentielle du romarin et du thym a donné des courbes similaires ce qui laisse supposer que l'extraction de ces huiles fait intervenir les même phénomènes.
- L'analyse de l'huile essentielle de romarin obtenue par entraînement à la vapeur d'eau par chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier 67 constituants cette huile est riche en verbenone,  $\beta$ -caryophyllene, camphre, et linalol.
- L'analyse par spectrométrie de masse de l'huile essentielle de thym obtenue par entraînement à la vapeur d'eau a permis d'identifier 24 constituants dont les majoritaires sont le carvacrol, le thymol, le p-cymene et le  $\gamma$ -terpinène.
- Les deux huiles essentielles présentent des effets insecticides sur *Rhyzopertha Dominica*. Nous remarquons que la toxicité augmente avec la dose quelque soit l'huile ou le mode de pénétration. Parmi les deux huiles essentielles testées, le thym montre la plus grande efficacité par contact. Par contre pour l'inhalation, les deux huiles manifestent presque le même effet toxique sur l'insecte.
- La durée d'action des deux huiles testées est limitée puisqu'elles ne sont plus toxiques après une semaine. Ceci laisse supposer que nos deux huiles sont biodégradables, caractéristique recherchée pour remplacer les insecticides organiques de synthèse dans les lieux de stockage des céréales.

- Les deux huiles essentielles possèdent une activité répulsive vis à vis de *Rhyzopertha Dominica*.
- Concernant l'association des deux huiles, les résultats obtenus sont loin de nous éclairer sur le comportement de ce mélange. De plus profondes études doivent être menées pour affirmer s'il y a synergisme ou antagonisme quand le romarin et le thym sont mélangés.
- A la lumière de ces résultats, le romarin et le thym présentent des effets insecticides sur *Rhyzopertha Dominica*. Cette propriété pourrait se révéler d'un intérêt certain dans la production des cultures et la préservation des denrées stockées des régions tempérées et tropicales.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] V. E. HARTMANN, P. RACINE, J. GARNERO, YTOLLARD D'AUDIFFRET  
Parf. Cosm. Arôm., 36, 33-40, (1980).
- [2] C. REGNAULT-ROGER, A. HAMRAOUI  
Influence des huiles essentielles aromatiques sur *Acanthoscelides Obtectus* (say),  
Bruches du Haricot. « Communication aux journées de la société botanique », 11,  
(1991).
- [3] R. C. Saxena, O. P. DIXIT and V. HARSHAN  
Insecticidal action of *lantana camara*.  
Against *C. allosobruchus chinensis*. (Coleoptera : bruchidax), vol 28, N° 4,  
(1992).
- [4] J. PEMONGE, M.J. PASCAL-VILLALOB and C. REGNAULT-ROGER  
Effets of materials and extracts of *trigonella foenum-graecom*. L  
Against the stored product pests *tribolium castaneum* (Herbst) and *Acanthoscelides*  
*Obtectus* (say), (1997).
- [5] S. HAMOUDI  
Projet de fin d'études d'Ingenieur, Département de Génie Chimique, E.N.P, Alger,  
(2002).
- [6] T. BOUKHALAFA  
Thèse magistère, apport du couplage CPG/SM et CPG/TR. TF dans l'analyse des  
mélanges naturels complexes exemple de l'huile essentielle de romarin, USTBH,  
Alger, (1991).
- [7] J. A. BATTANDIER, L. TRABUT  
« Fleurs d'Alger », Ed. Entreprise Nationale du Livre, Alger, (1984).
- [8] M.H. BOELENIS  
Perf. Flav., Arôm., 10, 22-37, (1985).
- [9] H. POURRAT; J. LEMEN  
PERF. FLAV., (1985).

- [10] R. MAIRE  
Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord, 23, 163-222, (1932).
- [11] J. L. ROSUA, A. GARCIA-GRANADOS  
Plant. Médecin. Phytother., 21, 138-143, (1987)
- [12] A. ROLET  
« Les plantes à parfum et les plantes aromatiques », Ed. J. B. Baillière et fils, (1930).
- [13] H. GARCIA ARAEZ. H  
« Esenciales Naturales 255 », Aquillar SA de Ediciones, Madrid, (1953).
- [14] A. S. GUBB  
« La flore algérienne naturelle et acquise », Ed. A Jourdan, Alger; (1913).
- [15] E. GUENTHER  
« The essential oils », vol III, ROBERT KRIEGER PUBLISHING Co.; HUNTINGTON, N. Y (1972).
- [16] [www.home.nordnet.fr/~vrodzko/plantes/romarin.html](http://www.home.nordnet.fr/~vrodzko/plantes/romarin.html)
- [17] ENCYCLOPEDIE. UNIVERSALIS (2000).
- [18] J. GARNERO  
Techniques de l'ingénieur les huiles essentielles, vol 12.
- [19] E. PERROT  
« La culture des plantes médicinales », Ed. J.B. Baillière et fils, Paris, (1947).
- [20] R. ROL; M. JACAMON  
« Flores des arbustes et arbrisseaux : Régions méditerranéennes », Tome 3, Ed. La maison rustique, Paris, (1968).
- [21] G. FOURNIER ; J. HABIB ; A. REGUIGUI; F. SAFTA; S. GUETARI; R. CHEMLI  
Plant. Médecin. Phytothér., 23, 180-185, (1983).
- [22] G. FLAMINI, P. L. CIONI  
Rivista Ital. EPPOS. , Ottavo, 21-24, (1992).
- [23] K. P. SVOBODA, S. G. DEANS  
Flav. Frag. J., 7, 81-87, (1992).

- [24] N. ARNOLD, G. VALENTINI, BELLOMARIA, H. LAOUER. H  
J. Essent. Oil. Res., 9, 167-175, (1997).
- [25] MUSA ÖZCAN  
Antioxydant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) extracts on natural  
olive and seame oils, (1999).
- [26] D. P. PAPACHRISTOS and D. C. STAMOPOULOS  
Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours  
on *Acanthoscelides obtectus* (say) (Coleoptera : Bruchidae).
- [27] H. MAKHLOUF  
Projet de fin d'études d'Ingenieur, Institut National Agronomique, Alger, (2002).
- [28] C. BOUTEKEDJRET  
Thèse de Doctorat d'Etat, Département de Génie Chimique, E.N.P, Alger,  
(1999).
- [29] P. QUEZEL; S. SANTA  
« Nouvelles flores d'Algérie et des régions désertiques méridionales »,  
Tome2, Ed. CNRS, Paris, (1963).
- [30] H. RICHARD, B. BENJILALI, N. BANQUOIR et O. BARITAUX  
Etude de diverses huiles essentielles de thym du Maroc.  
Lebensm-Wiss U-Technol. (1985).
- [31] J. BELKHADAR  
« Médecine traditionnelle et toxicologie ouest saharienne », Ed. Techniques  
nord-africaines, Rabat, (1978).
- [32] [www.docteur-nature.com/toutes\\_therapeutiques/produits\\_vegetaux/  
plantes\\_medicinales/thym.htm](http://www.docteur-nature.com/toutes_therapeutiques/produits_vegetaux/plantes_medicinales/thym.htm)
- [33] [www.saveurs.sympatico.ca/ency\\_1/thym/thymedi.htm](http://www.saveurs.sympatico.ca/ency_1/thym/thymedi.htm)  
[Autres résultats, domaine [www.saveurs.sympatico.ca](http://www.saveurs.sympatico.ca)]
- [34] J-L. ABRASSART  
« Mille et une vertus des huiles essentielles », Ed Guy Trédaniel, (1988).
- [35] Y.- R NAVES  
« Qu'est-ce une huiles essentielles ? », Industrie chimique belge, (1964), p  
11 Parfums, cosmétiques, savons 9, 200, (1966).
- [36] AFNOR (Association Française de Normalisation)  
Recueil des normes Françaises, huiles essentielles, 5<sup>e</sup> Edition 1996, T.2, p4.

- [37] ROUESSAC  
Analyse Chimique (Méthode et technique), Ed. Dunod-Paris (1998).
- [38] J. BRUNETON  
« Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales », 2<sup>e</sup> édition, Tech et Doc, Lavoisier, Paris, (1993).
- [39] D.L.M.MARIO and A.T. PEANA  
Effects of soil properties on yield and composition of *rosmarinis officinalis* essential oil research, n°10, (1998).
- [40] J. BRUNTON  
« Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales », 2<sup>e</sup> édition, Tech et Doc, Lavoisier, Paris, (1995).
- [41] J. BRUNTON  
« Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales », 3<sup>e</sup> édition, Tech et Doc, Lavoisier, Paris, (1999).
- [42] T. C Zerarka  
Méthodes spectrométriques d'analyses chimiques, Ed O.P.U, Alger, (1994).
- [43] A.GUILLAUME  
Les animaux ennemis de nos cultures, procédés de destruction, Ed Poutier, serv. Prot. Vég, paris, (1938).
- [44] P.LEPESME  
Les coléoptères des denrées alimentaires et des produits industriels entreposés. Ed, Lechevalier, Paris, (1944).
- [45] A. KELLOUCHE  
Efficacité de quelques insecticides vis-à-vis d'un insectes des denrées alimentaires stockées : *Rhyzopertha Dominica* (Coleoptera-Bostrychidae), (1979).
- [46] A. L. LEPIGRE  
Les insectes du logis et du magasin : Lutte contre les insectes ennemis du commerçant et de la ménagère, Ed Insectarium, Jardin d'essai, Alger, (1951).
- [47] B.R. CHAMP et C. E. DYTE  
Rapport de l'enquête mondiale de la F.A.O. sur les insectes des céréales entreposées et leur sensibilité aux insecticides. Ed. F.A.O., Rome, (1978).
- [48] C. POTTER  
The biology and distribution of *Rhyzopertha Dominica*. Tran. Rev. Entomol. Soc. London., 83, Part. IV, (1935).

- [49] Institut technique des céréales et des fourrages ; « Les insectes et les acariens des céréales stockées » ; Ed. Normes et techniques; (1978).
- [50] A. CAVELLIER, cours de phytopharmacie générale.  
L'Institut National d'Agronomie, Alger (1975).
- [51] Technique de l'ingénieur les huiles essentielles : propriétés physico-chimiques,  
Garnero K435.
- [52] A. PORTE, S. L. GONCALVES, H. S. TORQUILHO, M. KOKETSU, R.L.O.  
GODOY  
Essential oil of *Rosmarinus officinalis* (rosemary) from Rio de Janeiro, Brazil  
In : Journal essential oil research, n°12.
- [53] ANONYME  
Index phytosanitaire, ACTA, 28<sup>e</sup> édition, Sophie Cluzeau, 519 pages (1992).
- [54] F. A. TALUKDER and P. E. HOWSE  
Deterrent and insecticidal effects of extracts of pithraj, *Aphanamixis polystachya*  
(Meliaceae), against *Tribolium castaneum* in storage.
- [55] B. N. ISLAM  
Pesticidal action of neem and certain indigenous plants and weeds of Bangladesh,  
in Proceedings 2<sup>nd</sup> International Neem Conference, Rauschholzhausen, (1984).
- [56] ] K. S. ISLAM  
Studies on the growth disrupting effects of plant extracts and isolates of neem,  
chinaberry and pithraj in *Epilachna 12-punctata* Muls. MSc (Ag) thesis.  
Department of Entomology, Bangladesh Agricultural University, Mymensing,  
(1985).