

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAÂD DAHLAB DE BLIDA
FACULTE
DEPARTEMENT DE CHIMIE INDUSTRIELLE



MÉMOIRE DE MASTER
En Chimie Industrielle
Spécialité : Matériaux et produits organiques industrielle

**Etude de l'influence de la méthylation de l'huile
Essentielle de l'origan vis-à-vis du charançon de blé**

Par
LACHI ASMA

Devant le jury composé de :

Mr MOULAY .S	Professeur	USDB	Examineur
Mr DJALAB .K	Maitre assistant (A)	USDB	Observateur
Mr BOUTOUMI .H	Maitre de conférences (A)	USDB	Encadreur
Mr FETAKA .M	Maitre assistant (A)	USDB	Président
Mr KHODJA .M	Professeur	USDB	Examineur

Année Universitaire 2011/2012

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mon très cher père et ma très chère mère, en témoignage de ma reconnaissance pour le soutien et l'encouragement qui m'ont été bénéfique pour pouvoir en arriver là.

A la mémoire de mon grand père qui m'a toujours aimé et comblé par ses bénédictions, que dieu le tout puissant le reçoive en son vaste paradis.

A mes chères sœurs **IMANE** et **ZINEB** et mon cher frère **SALAH ADINE** Pour leur soutien, et d'avoir accepté de m'écouter parler de ce mémoire pendant des mois

A mes chères tantes : **LINDA, MALIKA, FATHIHA**.

A mes chères oncles : **RACHIDE, AYACHE**.

A mon promoteur **Mr.BOUTOUMI**, qu'il trouve à travers ce travail l'expression de mon grand respect

A tous mes amis :(**RADIA, IMANE, LOUIZA, HAJER, AMINA, MOUNIRA, ASMA, SARA, FATI**) pour leur soutien moral et leur gentillesse, aucune dédicace, ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond amour que je vous porte.

A tous ceux qui me sont chères.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime

A toute personne qui a contribué à la réalisation de ce mémoire.

LACHI ASMA

RESUME

La méthylation de l'huile essentielle de l'origan, extraite par entraînement à la vapeur d'eau, par le diméthyle sulfate a provoqué une réduction considérable de l'activité antioxydante en utilisant la méthode du FRAP et de l'activité anti-radicalaire le DPPH, Les résultats de IC50 confirmé IC50 de l'huile essentielle de l'origan ($53.20 \cdot 10^6$) mg/mL et celle de l'huile essentielle méthyles IC50 ($94.59 \cdot 10^6$) mg/mL.

La diminution du caractère acide et l'augmentation de l'hydrophobicité a augmenté l'activité insecticide de l'huile essentielle par le cas de l'application par contacte DL50 (0.14 g/mL) vis-à-vis de l'application par fumigation DL50 (0.28 g/mL).

Mots clés : origan, l'huile essentielle, contact, fumigation, antioxydante, anti-radicalaire, DPPH, FRAP, DL50.

Abstract

The methylation of the essential oil of the origan, extracted by drive with the water vapor, by dimethyl sulphates caused a considerable reduction of the antioxydant activity by using the method of the FRAP and the anti-ridicalizing activity the DPPH, the results of IC50 confirmed IC50 of the essential oil of the origan ($53.20 \cdot 10^6$) mg/mL and that of essential oil methyls IC50 ($94.59 \cdot 10^6$) mg/mL.

The reduction in the acid character and the increase in the hydrophobicity increased the insecticidal activity of essential oil by the case of the application by contacts DL50 (0.14 g/mL) with respect to the application by fumigation DL50 (0.28 g/mL).

Key words: origan, oil essential, contact, fumigation, antioxydant, anti-ridicalizing, DPPH, FRAP, DL50.

Sommaire

Introduction générale	1
Première partie : les huiles essentielles	
2.1. Définition	2
2.2. Historique.....	2
2.3. Procédé d'extraction de l'huile essentielle.....	3
2.3.1. Distillation (hydrodistillation).....	3
2.3.2. Entraînement la vapeur d'eau.....	3
2.4. Rôle des huiles essentielles chez les plantes.....	3
2.5. Localisation des huile essentielle et les structures glandulaires des plants	4
2.6. Les constituants chimiques des huiles essentielles	6
2.6.1. La biogénèse de quelque famille de produits naturels	6
2.7. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	11
2.8. Les activités biologiques et pharmacologiques des huiles essentielles	11
2.8.1. Toxicité des huiles essentielles.....	11
2.8.2 .Activités biologiques	12
2.8.3. Activités pharmacologiques	13
2.9. Méthode de lutte contre les insectes des données stockées	13
2.9.1. Lutte chimique	14
2.9.2. Lutte physique et mécanique	14
2.9.3. Lutte biologique	15
2.10. Modification chimique des phénols (méthylation).....	16
2.10.1. Alkylation : synthèse d'éthers (méthylation).....	16

2.10.1.1. Méthylation avec d'iodure de méthyl	16
2.10.1.2. Méthylation avec le diazo méthane	16
2.10.1.3. Méthylation avec le diméthyle carbonate (DMC)	17
2.10.1.4. Méthylation avec le diméthyle sulfate (DMS)	18

Deuxième partie : Matériels et méthodes

3. Matériel d'étude	19
3.1. Matériel non biologique	19
3.2. Matériel biologique	19
3.2.1. Matériel animal	19
3.2.1.1. Aperçu générale sur Sitophilus oryzae	19
3.2.1.1.1. Position systématique	19
3.2.1.1.2. Origine et répartition géographique	19
3.2.2. Matériel végétal	20
3.2.2.1. Origan (Origanum glandulosum).....	21
3.2.2.1.1. Classification (Dobignard, 2008).....	21
3.2.2.1.2. Description botanique.....	22
3.2.2.2. Appareillage	22
3.2.2.2.1. Extraction de l'huile essentielle par entrainement la vapeur d'eau sèche.....	22
3.2.3. Modification chimique de l'huile essentielle de l'origan et thymol synthétique	25
3.2.3.1. La méthylation de l'huile essentielle de l'origan	25
3.2.3.2. La méthylation de thymol synthétique	25
3.3. Caractéristiques d'huile essentielle de l'origan avant et après la méthylation.....	26
3.3.1. Caractérisation physico-chimique	26

3.3.1.1. Indice de réfraction	27
3.3.1.2. L'indice d'acide (I_A)	27
3.3.1.3. Indice d'ester	28
3.3.2. Analyse des huiles essentielles par les méthodes chromatographiques.....	30
3.3.2.1. La Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	30
3.3.2.2. Analyse par spectrométrie infrarouge (IR)	31
3.3.2.3. La Chromatographie en phase gazeuse couplés par spectre de masse (CG/MS).....	32
3.4. Séparation de thymol à partir de l'huile essentielle de l'origan.....	33
3.5. L'évaluation de l'activité antioxydant	34
3.5.1. Réaction du fer : FRAP (ferric reducing antioxidant power)	34
3.5.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)	35
3.6. Application de l'huile essentielle sur les charançons de blé.....	37
3.7. Evaluation de l'activité insecticide de l'huile essentielle	38
3.7.1. Test d'efficacité par contact.....	38
3.7.1.1. Exploitation des résultats	38
3.7.1.1.1. Correction de la mortalité.....	38
3.7.1.1.2. Calcul des doses létales DL50	39
3.7.2. Test d'efficacité par inhalation.....	40

Troisième partie : résultats et discussion

4.1. Etude du rendement de l'extraction de l'huile essentielle de l'origan.....	41
4.2. Etude analytique.....	43
4.2.1. Détermination des indices physico-chimiques	43
Discussion des résultats.....	43
4.2.2. Méthode d'analyse chromatographique en phase gazeuse (C P G).....	44
4.2.2.1. Identification des substances chimiques de thymol et thymol méthyles.....	44
4.2.2.2. Identification des substances chimiques de huiles essentielle de l'origan sans les composes phénoliques et thymol séparés.....	45
4.2.2.3. Identification des substances chimiques de huile essentielle de l'origan et huile essentielle de l'origan méthyles.....	46
Discussion des résultats.....	47
4.2.3. Analyse l'huile essentielle de l'origan méthyles par CG-MS.....	48
Discussion des résultats.....	50
4.2.4. Analyse par spectrométrie infrarouge (IR)	51
Discussion des résultats N°1	53
Discussion des résultats N°2.....	56
4.3. Tests in vitro de l'activité antioxydante	57
4.3.1. Réduction du fer (FRAP).....	57
4.3.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....	60
4.3.2.1. Acide ascorbique.....	60
Discussion des résultats	64
4.4. Evaluation de l'activité insecticide des huiles essentielles sur le charançon du blé (Sitophilus Oryzae).....	65

4.4.1. Test d'efficacité par contact.....	65
4.4.2. Test d'efficacité par inhalation.....	70
Discussion des résultats	75
<i>Conclusion</i>	76
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexe</i>	

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Biogénèse des constituants chimiques des huiles essentielles

Figure 02: Biosynthèse des terpènes

Figure 03: Exemples des structures des terpènes

Figure 04: Développement de *Sitophilus oryzae*

Figure 04(1): Larve de *Sitophilus oryzae* L

Figure 04(2): Adulte de *Sitophilus oryzae* L

Figure 05: La plante de l'origan sèche.

Figure 06: Dispositif de l'entraînement à la vapeur d'eau

Figure 07: Réfractomètre

Figure 08: Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Figure 09: Courbe de rendement de l'huile essentielle de l'origan

Figure 10: Rendement cumulé de l'huile essentielle de l'origan

Figure 11 : chromatographie phase gazeuse de thymol

Figure 12: chromatographie phase gazeuse de thymol méthyles

Figure 13 : chromatographie phase gazeuse de l'huile essentielle de l'origan sans les composés phénoliques

Figure 14: chromatographie phase gazeuse de thymol et carvacrol séparé

Figure 15: chromatographie phase gazeuse de l'huile essentielle d'origan

Figure 16: chromatographie phase gazeuse de l'huile essentielle d'origan méthyles

Figure 17: Profil chromatographique de l'huile essentielle de l'origan méthyles par CG/MS

Figure 18: Spectre infrarouge de thymol.

Figure 19: Spectre infra rouge de l'huile de thymol méthyles

Figure 20: Spectre infrarouge de l'huile essentielle de l'origan.

Figure 21: Spectre infrarouge de l'huile essentielle d'origan méthyles.

Figure 22: Pouvoir réducteur de thymol, thymol méthyles et de l'acide ascorbique

Figure 23: Pouvoir réductrice de l'huile essentielle de l'origan, l'huile essentielle méthyles et l'acide ascorbique

Figure 24: L'histogramme de l'activité antioxydant de différentes substances

Figure 25: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'Acide Ascorbique

Figure 26: L'activité anti-radicalaire de thymol et l'huile de thymol méthyles en fonction de concentration

Figure 27: L'activité anti-radicalaire d'huile essentielle de l'origan et de l'origan méthyles en fonction de concentration

Figure 28: Comparaison des valeurs IC50 des nôtres substances avec acide ascorbique

Figure 29: Efficacité par effet contact de solution de thymol après 24h

Figure 30: Efficacité par effet contact de l'huile de thymol méthyles après 24h

Figure 31: Efficacité par effet contacte de l'huile essentielle de l'origan après 24 h

Figure 32: Efficacité par effet contacte de l'huile essentielle de l'origan méthyles après 24h

Figure 33: Comparaison des valeurs DL50 de l'efficacité les substances par effet contact

Figure 34: Efficacité par effet fumigation de solution de thymol après 24h

Figure 35: Efficacité par effet fumigation de l'huile de thymol méthyles après 24h

Figure 36: Efficacité par effet fumigation de l'huile essentielle de l'origan après 24h

Figure 37: Efficacité par effet fumigation de l'huile essentielle de l'origan méthyles après 24h

Figure 38: Comparaison des valeurs DL50 de l'efficacité les substances par effet fumigation

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 01: Réaction de méthylation des phénols avec d'iodure de méthyle

Schéma 02: Réaction de méthylation des phénols avec le diazométhane

Schéma 03: Réaction de méthylation des phénols avec diméthyle carbonate (DMC)

Schéma 04: Réaction de méthylation des phénols avec le diméthyle sulfate (DMS)

Schéma 05: Réaction de l'hydrolyse

Schéma 06: Réaction de séparation de thymol

Schéma 07: Réaction du carvacrol avec un radical peroxyde

Schéma 08: Stabilisation du radical formé par résonance

Schéma 09: Réaction du thymol avec un radical peroxyde

Schéma 10: Stabilisation du radical formé par résonance

Schéma 11: Réaction du carvacrol avec un radicale DPPH

Schéma 12: Stabilisation du radicale formé par résonance

Schéma 13: Réaction du thymol avec un radicale DPPH

Schéma 14: Stabilisation du thymol formé par résonance

Schéma 15: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°01: Les parties des certaines plantes riches de l'huile essentielle

Tableau N°02: Classification botanique de l'origan

Tableau N°03: Condition opératoire de CPG (colonne polaire)

Tableau N°04: Les pourcentages de mortalité corrigée sont transformés en probits

Tableau N°05: Rendement cumulatif de l'huile essentielle de l'origan en fonction de temps

Tableau N°06: Les indices physico-chimiques de l'HE, HEM, et THM.

Tableau N°07: les principaux constituants de l'huile essentielle d'origan méthyles analysée par CG/MS.

Tableau N°08: résultats d'absorbance de différente substance par méthode de FRAP

Tableau N°09: les résultats absorbance d'acide ascorbique et pourcentage d'activité anti-radicalaire

Tableau N°10: Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations des substances

Tableau N°11: Valeurs des IC50 en (ng/ml) de l'HE, L'HEM, TH, THM et de l'Acide Ascorbique.

Tableau N°12: Mortalité par contacte des insectes traités par solution de thymol.

Tableau N°13: Mortalité corrigée par contacte des insectes traités par solution de thymol

Tableau N°14: Mortalité par contacte des insectes traités par l'huile de thymol méthyles.

Tableau N°15: Mortalité corrigée par contacte des insectes traités par l'huile thymol méthyles

Tableau N°16: Mortalité par contacte des insectes traités par l'huile essentielle de l'Origan.

Tableau N°17: Mortalité corrigée par contacte des insectes traités par l'huile essentielle d'origan

Tableau N°18: Mortalité par contacte des insectes traités par l'huile essentielle de l'Origan méthyles.

Tableau N°19: Mortalité corrigée par contacte des insectes traités par l'huile essentielle d'origan méthyles

Tableau N°20: Efficacité des substances étudiée par contact après 24 heures d'exposition.

Tableau N°21: Mortalité par fumigation des insectes traités par solution de thymol

Tableau N°22: Mortalité corrigée par fumigation des insectes traités par solution de thymol

Tableau N°23: Mortalité par contacte des insectes traités par l'huile de thymol méthyles

Tableau N°24: Mortalité corrigée par fumigation des insectes traités par l'huile thymol méthyles

Tableau N°25: Mortalité par fumigation des insectes traités par l'huile essentielle de l'Origan.

Tableau N°26: Mortalité corrigée par fumigation des insectes traités par l'huile essentielle d'origan

Tableau N°27: Mortalité par contacte des insectes traités par l'huile essentielle de l'Origan méthyles.

Tableau N°28: Mortalité corrigée par fumigation des insectes traités par l'huile essentielle d'origan méthyles

Tableau N°29: Efficacité des substances étudiée par fumigation après 24 heures d'exposition.

Symboles et Abréviations

HE: Huile essentielle

HEM: Huile essentielle méthylé

TH: Thymol

THM: Thymol méthyle

CPG: Chromatographie en phase gazeuse

CG/SM: Chromatographie en phase gazeuse couplée par spectromètre de masse

IR : Infra-Rouge

DL50 : Dose létale de 50

n_D^{20} : Indice de réfraction.

M : Le pourcentage de mortalité dans la population traitée.

M_c : Le pourcentage de mortalité corrigé.

M_t : Le pourcentage de mortalité dans la population témoin.

t_R : Temps de retentions.

FRAP: Ferric reducing antioxidant power

DPPH: 2, 2-diphényl -1- picrylhydrazyl

DMS : Diméthyle sulfate

DMSO :Diméthyle sulfoxyde

DMC : diméthyle carbonate

DBU : 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene

IPP: isoprènes pyrophosphate

GPP : pyrophosphate de géranyle

FPP : trans-famésyle pyrophosphate

SN2 : substitution nucléophile d'ordre N°2

Rc : rendement cumulatif

AC : acide ascorbique

IA : indice d'acide

IE : indice d'estre

IC50 : concentration inhibitrice de 50%

EC50 : Efficient concentration 50%

Di : dose

C : concentration

Abs : absorbance



Introduction générale

Introduction générale :

Les métabolites secondaires constituent une source inépuisables de produits utilisés par les plantes et les êtres vivant pour se défendre, se soigner, et se nourire. L'huile essentielle est très appréciée en tant que métabolite secondaire par la variété de sa composition chimique et son large spectre d'application.

Beaucoup de travaux et en particulier ceux réalisé dans le domaine de la lutte contre les pestes et les maladies, essayent d'établir une corrélation entre la structure chimique et l'activité de l'huile essentielle [1].

Certains auteurs attribuent l'activité insecticide du la rue aux cétones et en particulier au 2-undecanone [2]. L'activité neurotoxique des cétones est exploitée dans le domaine de la lutte contre les blattes germanique et les moustiques [3].

Malgré les avantages écologiques de l'utilisation des huiles essentielles du point de vue biodégradabilité et l'absence de résistance de la part des ravageurs. La disponibilité de ces substances reste toujours limitée à cause de leurs productions saisonnières et leurs faibles rendements.

Pour remédier à ces anomalies, notre travail consiste à améliorer les propriétés de l'huile essentielle de l'origan. Cet objectif doit être atteint en exécutant les taches suivantes :

Premièrement, le choix de la méthode d'extraction appropriée à l'espèce végétale étudiée en relation avec la composition de l'huile essentielle et sa stabilité chimique et thermique.

Deuxièmement, le choix de la méthode de méthylation adéquate aux composés de l'huile essentielle extraite.

Troisièmement, la caractérisation physico-chimique de différentes substances obtenues par extraction et alkylation.

Enfin, le travail proposé est clôturé par l'étude de la stabilité antioxydante et anti-radicalaire dus à la modification chimique avec les conséquences de celle-ci sur l'activité insecticide de l'huile essentielle vis-à-vis des charançons de blé.



Chapitre N°1 :

Les huiles essentielles

2.1. Définition :

Il existe plusieurs expressions pour définir huile essentielle. La norme française, AFNOR NF T 75-006, donne comme définition « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation « sèche ». Cependant cette définition par procédé peut être considérée restrictive. La définition qui semble la plus universellement acceptée est la suivante « huile obtenue suite à l'extraction de la matière végétale à la vapeur d'eau ». Cette huile est composée d'un mélange des substances volatiles obtenues par co-distillation avec la vapeur d'eau. Celle-ci libère des substances renfermées dans les glandes de la plante, à des températures plus basses que leur propre point d'ébullition grâce à la contribution de la pression partielle de la vapeur d'eau [4].

2.2. Historique :

L'utilisation des huiles essentielles remonte aux plus anciennes civilisations: tout d'abord dans l'Orient et le Moyen Orient et par la suite au nord de l'Afrique et en Europe [5]. Les hydrolats (eaux aromatiques) étaient utilisés en Inde il y a plus de 7000 ans. Les plantes aromatiques figurent dans un traité publié en Chine par Shen Nung il y a environ 4 500 ans. Entre 3 000 et 2 000 ans avant notre ère, les Égyptiens faisaient un usage important des plantes aromatiques et aussi des plantes pour soigner les malades. Les premiers à utiliser l'hydrodistillation semblent être les Perses, 1 000 ans avant notre ère. L'utilisation des huiles essentielles était pratique courante chez les Grecs et plusieurs livres ont été publiés sur le sujet. Des exemples de cette littérature sont « Histoire naturelle » de Pline «Les Aphorismes» d'Hippocrate, «Traité des odeurs» de Théophraste et Pédanius Dioscoride a écrit un ouvrage sur la phytothérapie. Les Arabes ont apporté une amélioration significative dans la chimie et dans la distillation des huiles. Vers la fin du XVI^{ième} et du XVII^{ième} siècle, plus de 100 huiles essentielles sont utilisées. Louis XIV se parfumait de ces huiles. Dans l'histoire moderne, les vertus thérapeutiques des huiles essentielles occupent une place de plus en plus importante. En 1928 le chimiste français René-Maurice Gattefosse a utilisé le terme aromathérapie pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles lorsqu'il a découvert par accident que la lavande a guéri une brûlure à sa main. En 1964 le docteur français Jean Valunet a connu du succès en traitant des patients en médecine et en psychiatrie. Aujourd'hui, nous reconnaissons que les huiles essentielles ont des effets pharmacologiques, psychologiques et physiologiques sur l'homme.

2.3. Procédés d'extraction :

L'obtention des huiles essentielles fait appel à deux méthodes générales :

- Soit l'entraînement à la vapeur d'eau sèche.
- Soit par l'Hydrodistillation.

La technique à employer devrait être choisie selon les caractéristiques d'huile essentielle. [6, 7,8]

2.3.1. Distillation : hydrodistillation

La hydrodistillation est la méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles.

Les extraits végétaux sont chauffés jusqu'à ébullition ; l'huile essentielle s'évapore alors avec les vapeurs dégagées, puis est condensée (elle redevient liquide lorsqu'on la refroidit) et séparée de l'eau.

2.3.2. L'entraînement à la vapeur sèche :

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats, le procédé de l'entraînement à la vapeur sèche est pulsé. Les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent. Ces dernières sont alors vaporisées et condensées dans un serpentin réfrigéré. La récupération de l'huile essentielle est la même que dans le cas de l'hydrodistillation.

2.4. Rôle des huiles essentielles chez les plantes :

Elles ont des fonctions multiples dans la nature. En effet, expérimentalement il a été établi qu'elles interviennent dans les interactions «végétaux-animaux » où elles constituent un moyen de communication. [9]

En raison de leur structure chimique unique, les huiles essentielles ont la capacité de pénétrer les parois cellulaires et de transporter l'oxygène, les nutriments et d'autres composés biochimiques vitaux jusqu'à l'intérieur de chaque cellule. Elles contiennent de puissants composés biochimiques qui donnent aux plantes la capacité de croître, de réparer les dommages à leur structure.

Back et Pemberton, ajoutent que les huiles essentielles d'agrumes protègent les fruits contre les proliférations et les attaques d'insectes. [10]

2.5. Localisation des huiles essentielles et les structures glandulaires des plantes :

Il est bien connu que la plupart des huiles essentielles se retrouvent dans des glandes. Les structures glandulaires et les cellules sécrétrices isolées peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs.

Il existe trois types de structures sécrétrices dans les plantes:

1) Les poils glandulaires épidermiques : les plantes possédant ces poils font partie des familles des Lamiacées, des Géraniacées, des Verbénacées, entre autres. À titre d'exemple, les feuilles de sauge officinale (*Salvia officinalis*) contiennent ce type de glandes.

2) Les poches sphériques schizogènes : les glandes de type poche se retrouvent chez des plantes des familles des Astéracées, Hypéricacées, Rosacées, Rubiacées, Rutacées et autres. Un bel exemple de ce type est l'Eucalyptus globulus.

3) Les canaux glandulaires lysigènes : on retrouve des canaux glandulaires dans tous les bois résineux et en particulier chez les Abiétacées et les Cupressacées; le pin maritime en est un exemple. Les familles suivantes contiennent aussi des espèces avec ce type de glande: les Apiacées (les fruits), les Dipterocarpacees, les Burséracées et les Anacardiacees.

Le tableau suivant donne des exemples de plantes et leurs parties riches en huiles essentielles.
[11]

Tableau N°01 : Les parties de certaines plantes riches en huiles essentielles.

Partie de plante	Exemple
Feuilles	Romarin, sauge
Feuilles de confères	Sapin, cèdre
Tiges	Citronnelle, lemongrass
Écorces	Cannelier
Racines	Angelica, vetiver
Rhizomes	Acorus, gingembre
Bulbes	Oignon
Bois	Santal
Fruits	Citron
Fleurs	Jasmin, rose
Graines	Aneth

Il est intéressant de dégager des caractéristiques botaniques de certaines familles de plantes en rapport avec la présence d'huiles essentielles. Les familles des conifères se caractérisent par la présence d'huiles essentielles dans presque toutes leurs structures telles les aiguilles, les bourgeons, les cônes (cèdres), les résines et les gommés (sapins). Tous les organes des Apiacées, une famille avec beaucoup d'espèces, peuvent contenir des huiles et surtout dans les fruits. La famille des Astéracées est la plus grande par le nombre de ses espèces, 20 000, et par leur présence sur tous les continents, autant dans les basses terres que sur les hauts plateaux. Ces plantes considérées comme les plus évoluées sont principalement des herbes qui se retrouvent dans des zones sèches. Beaucoup de ces plantes contiennent des huiles essentielles comme on peut constater par la liste ci-dessus et celle en annexe. Le polymorphisme chimique est omniprésent chez les espèces de cette famille.

La présence de constituants volatils sous forme de glycosides dans l'écorce est ce qui caractérise les Bétulacées. Les huiles essentielles se retrouvent surtout dans les rhizomes chez les Cypéracées. La famille des Lamiacées possède des caractéristiques similaires aux Astéracées au niveau de leur grande dispersion soit en zone tropicale ou en montagne.

Ces plantes, pour la plupart des herbes, possèdent des glandes épidermiques riches en huiles essentielles complexes.

Il y a autant d'espèces différentes chez les Lauracées, 2 000 à 2 500, que chez les Lamiacées. Ils sont très répandus sur notre planète et ce sont, pour la plupart, des arbres. Toutes les structures anatomiques contiennent des huiles. Deux autres familles de taille équivalente à celle des Lamiacées et des Lauracées est celle des Myrtacées et des Rutacées. Les espèces de plantes de ces familles sont surtout des arbres des zones tropicales et subtropicales.

2.6. Les constituants chimiques des huiles essentielles :

2.6.1. La biogénèse de quelques familles de produits naturels :

Tout comme les plantes sont classées en familles, les produits naturels sont aussi classés en familles. Les principales familles des produits naturels qui se retrouvent comme constituant chimique des huiles essentielles sont les terpènes et les phénylpropanes (composés aromatiques). Les composés de la dégradation d'acides gras et les composés de la dégradation des terpènes sont aussi fréquemment retrouvés dans les huiles essentielles. Tous ces produits émanent de la photosynthèse comme le montre la figure 01. L'acide pyruvique, produit du métabolisme des sucres, se transforme en acétyl coenzyme A. La condensation ramifiée de trois molécules de cette coenzyme donne l'acide mévalonique. Cet acide se transforme en deux unités d'isoprènes pyrophosphates (IPP), précurseurs des terpènes. Une autre voie métabolique, la condensation linéaire d'unités d'acétyl coenzyme A, donne les acides gras et les acétogénines comme le β -thujaplicine.

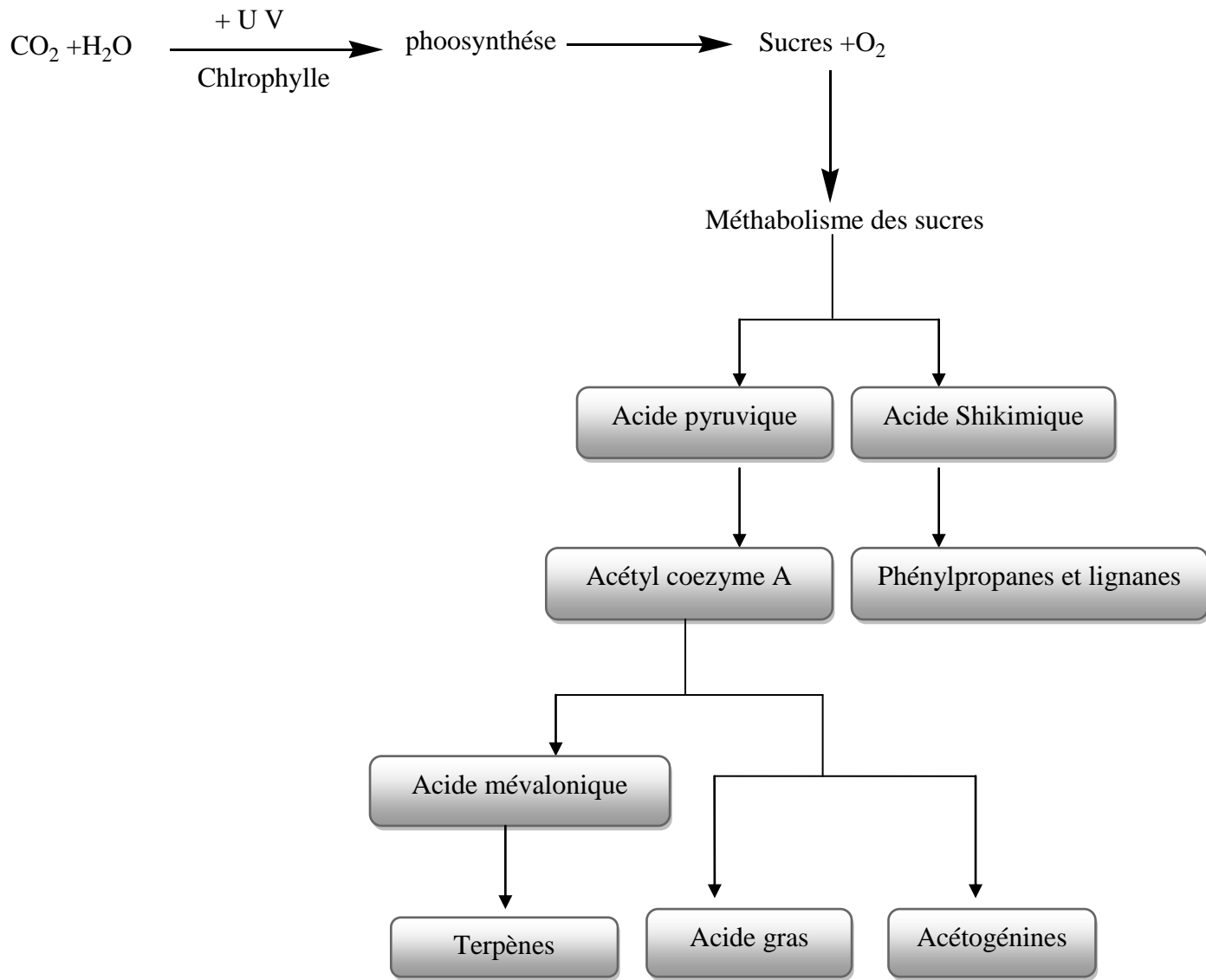


Figure 01 : Biogénèse des constituants chimiques des huiles essentielles

Les terpènes étant des constituants caractéristiques et importants de la plupart des plantes à l'huile essentielle, nous avons indiqué la biosynthèse de cette famille de produits naturels à la figure 2 [12]. L'acide mévalonique, métabolite important dans la biosynthèse des terpènes se transforme en deux unités de pyrophosphate d'isopentényle, IPP, et de pyrophosphate de β,β -diméthylallyle. La combinaison de ces deux pyrophosphates produit le pyrophosphate de géranyle (GPP) qui se transforme en géraniol et autres monoterpènes. La synthèse des autres terpènes s'effectue à la suite de condensations d'autres unités d'IPP.

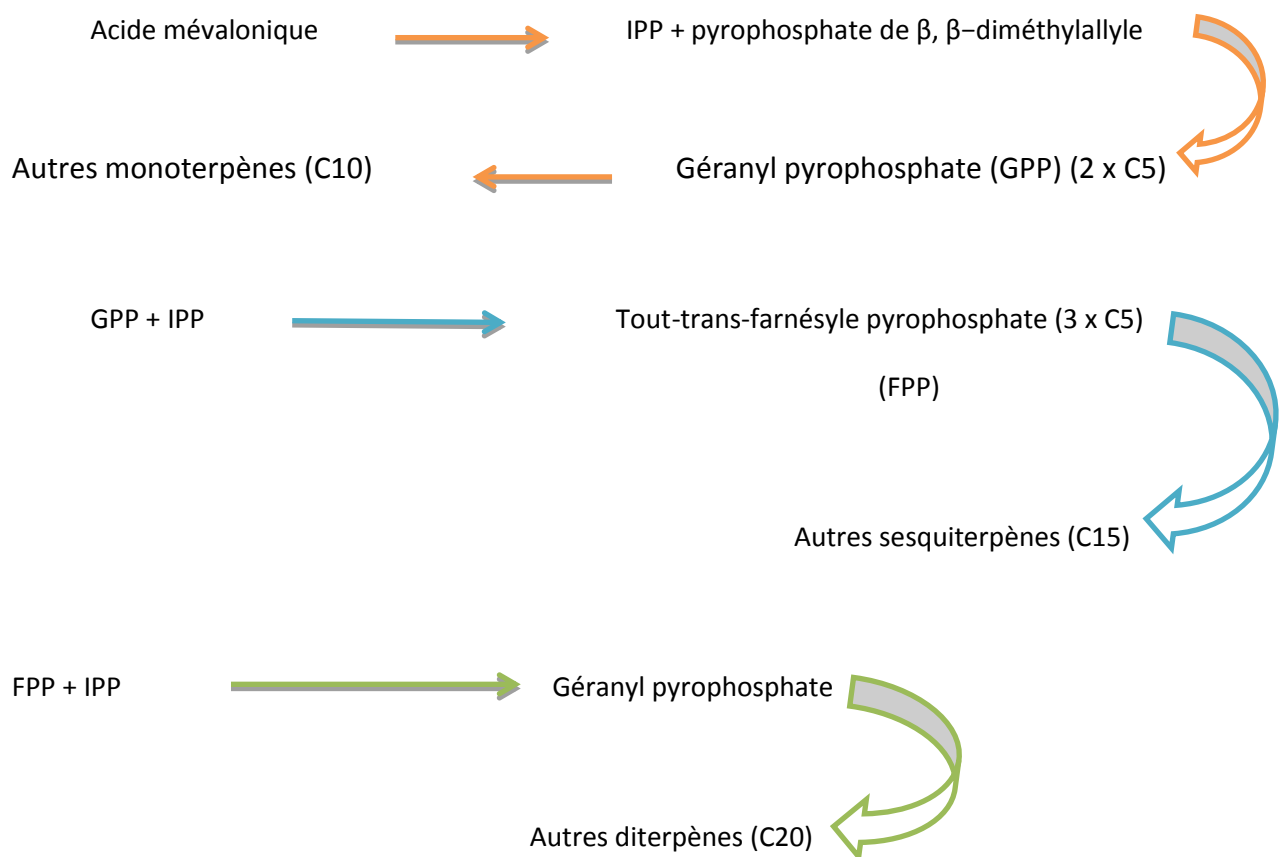
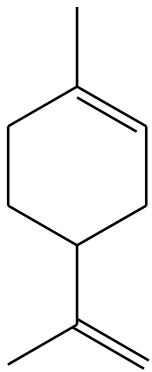


Figure 02 : Biosynthèse des terpènes.

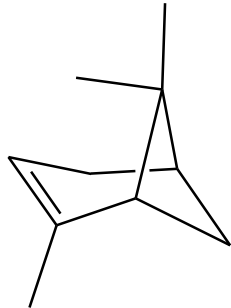
Des exemples de constituants chimiques ainsi que leur structure moléculaire sont illustrés aux figures 03 [12].

Monterpènes :

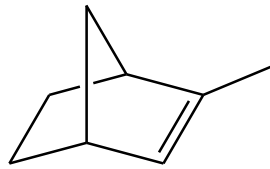
Hydrocarbures :



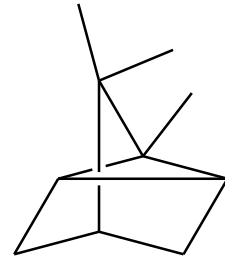
Limonène



α-Pinène

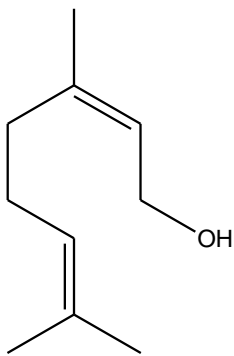


Santène

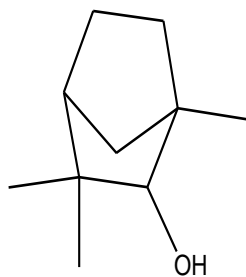


Tricyclène

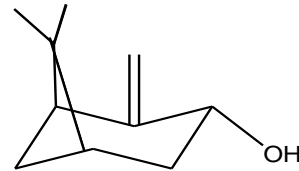
Alcools:



Nérol

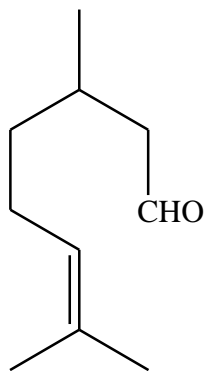


endo-fenchol

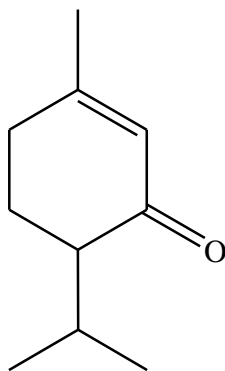


pinocarvéol

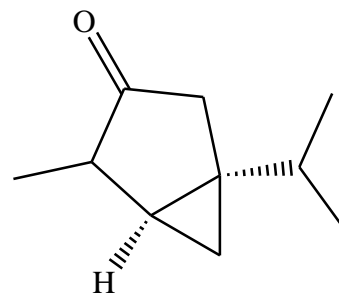
Aldéhydes et cétones :



citronellal

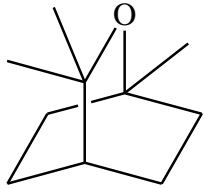


Pipéritone

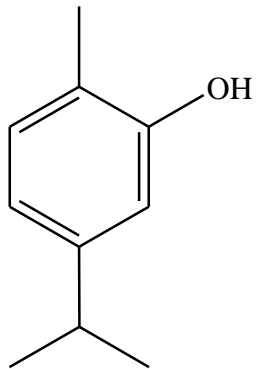


cis-thujone

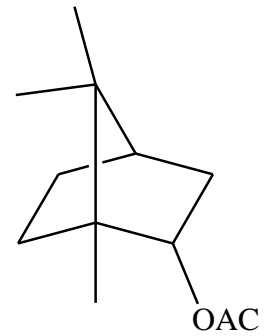
Esters, éthers et phénols :



1,8- cénéole



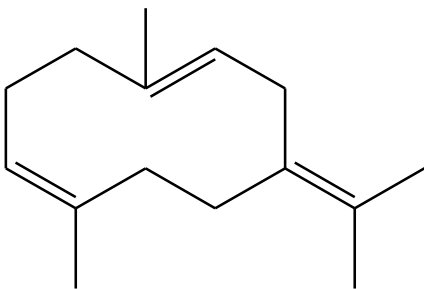
carvacrol



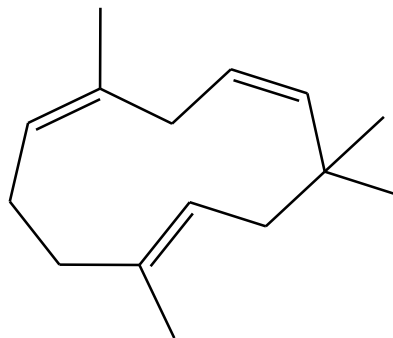
acétate de bornyle

Sesquiterpènes :

Hydrocarbures :

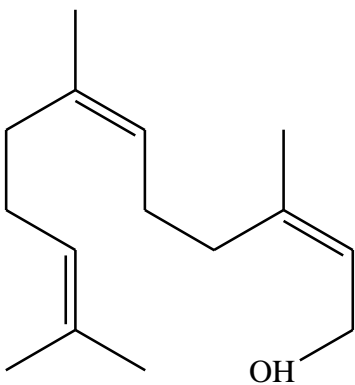


Germacrène B

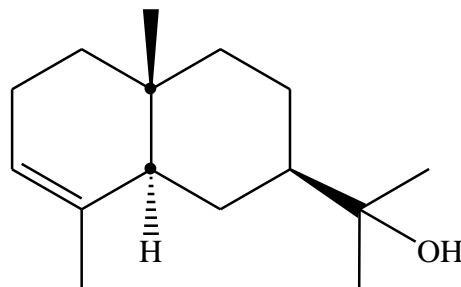


α -humulène

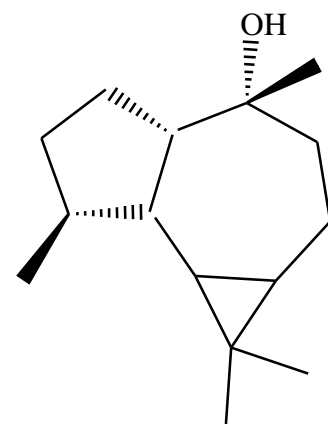
Alcools :



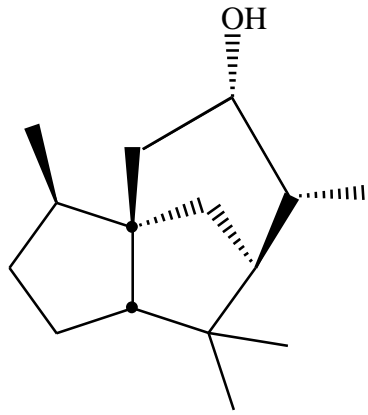
Cis-cis- farnésol



α - eudesmol



lédol



5-néo-cédranol

Figure 03: Exemples de structures de terpènes.

2.7. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des substances liquides à température ambiante, ayant une odeur souvent forte et très caractéristique. En général, elles sont incolores à jaune pâle à quelques exceptions telles que l'huile essentielle de camomille dont la couleur bleu clair. Les huiles essentielles sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques mais peu soluble dans l'eau.

Leurs densités est inférieure à l'unité (eau), l'exception faite des huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffran. Elles sont extrêmement volatiles et perdent rapidement leurs propriétés lorsqu'elles sont exposées au soleil ou à la chaleur, elles doivent être présentées dans des flacons ombrés pour une meilleure protection.

2.8. Activités biologiques et pharmacologique des huiles essentielles:

2.8.1. Toxicité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme".

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en Cinna aldéhyde. [13]

Il existe aussi quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers. [14]

2.8.2 .Activités biologiques :

Les plantes aromatiques et épices sont utilisées depuis des siècles dans les préparations alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais également pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques. Origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont autant de plantes aromatiques fréquemment utilisés comme ingrédients alimentaires.

Les huiles essentielles de ces plantes ont toutes une particularité commune: elles sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous. Reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol est l'ingrédient actif des rince-bouches et l'eugénol est utilisé dans les produits cosmétiques, alimentaires, et dentaires. Ces trois composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries. [15]

La plupart de ces composés sont également de très bons agents antifongiques. Le thymol, le carvacrol, et l'eugénol sont encore ici les composés les plus actifs. Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons. [16]

2.8.2.1. Antibactérienne:

Puisque les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géranial), etc.

[17, 18]

2.8.2.2. Antivirale :

Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles aujourd'hui, les HE constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques. [17, 18]

2.8.2.3. Antifongique :

Les mycoses sont d'une actualité criante, car les antibiotiques prescrits de manière abusive favorisent leur extension, avec les HE on utilisera les mêmes groupes que ceux cités plus haut, on ajoutera les sesquiterpéniques et les lactones sesquiterpéniques. Par ailleurs, les mycoses ne se développent pas sur un terrain acide. Ainsi il faut chercher à alcaliniser le terrain. [17, 18]

2.8.2.4. Antiparasitaire :

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites. [17, 18]

2.8.3. Activités pharmacologiques :

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont depuis peu massivement étudiées.

Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants. [19]

Le thymol et le carvacrol sont encore une fois les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes. [20]

L'activité antioxydant des huiles essentielles est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes mono terpéniques.

Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes [17,18]

2.9. Méthode de lutte contre les insectes des données stockées :

La protection des céréales stockées contre les attaques d'insectes et d'acariens soulève des problèmes variés et elle doit faire appel à un ensemble de techniques différentes qu'il est nécessaire d'appliquer à bon escient.

Le souci majeur d'un stockeur est de garder son stock de céréale intact.

Un ensemble de mesure préventive et curative, il s'agit de toutes techniques destinées à réduire l'infestation au champ, au début du stockage ainsi que pendant le stockage.

2.9.1. Lutte chimique :

Depuis la venue des composés organiques de synthèse, on regroupe les insecticides en insecticides organiques (les organochlorés, organophosphorés, carbamates et pyréthriinoïdes représentent les grandes majorités des insecticides organiques de synthèse qui ont été employés ou sont utilisés actuellement) [21], et inorganiques (généralement à base d'arsenic ou de fluo silice, ils sont aujourd'hui prohibés).

Largement répandue, en raison de son efficacité, elle doit être appliquée avec discernement pour limiter les risques qu'elle peut faire courir aux consommateurs des denrées. Deux types de traitement sont généralement employés :

- Traitement par contact :

Il consiste à recouvrir les grains, l'emballage ainsi que les locaux de stockage d'une pellicule de produit insecticide qui agit par contact sur les prédateurs, dont l'effet est plus ou moins rapide avec une persistance d'action plus longue.

- Traitement par fumigation :

La fumigation consiste à traiter les grains à l'aide d'un gaz toxique, qu'on appelle fumigant. L'intérêt majeur de la fumigation est de faciliter la pénétration des gaz à l'intérieur du grain et donc de détruire les oeufs, larves et nymphes qui s'y développent. [22, 23, 24]

2.9.2. Lutte physique et mécanique :

Elles concernent toutes les techniques mécano-thérapeutiques susceptibles de rendre le stock sain. En général, ces techniques ne sont pas efficaces contre les formes cachées. Elles sont recommandées pour pallier aux problèmes des résidus chimiques liés aux différents traitements chimiques appliqués aux denrées stockées. Ainsi plusieurs techniques ont été expérimentées et ont eu des succès divers : l'écrasement mécanique dans les « Entoletr », le traitement par le froid et le chaud, le stockage étanche ou sous atmosphère contrôlée et les radiations ionisante

La lutte par le froid consiste à abaisser la température de stockage, ce qui entraîne un ralentissement du développement des insectes, freiné dès que la température est inférieure à 10°C.

La lutte par le chaud consiste à une élévation de la température (température supérieure à 50°C), ce qui entraîne la mort des insectes. Le passage des produits dans un séchoir permet d'éliminer les insectes présents dans les grains.

2.9.3. Lutte biologique :

Ces dernières décennies, la protection de l'environnement s'impose de plus en plus comme une préoccupation mondiale majeure. La méthode classique de lutte biologique par utilisation de micro-organisme, de prédateurs, de parasitoïdes et de substances naturelles d'origine végétale, les industries agrochimiques orientent de plus en plus leur effort vers l'étude de produits naturels pour la recherche de nouveaux insecticides. [25]

Le concept de lutte biologique a subi une évolution au cours du temps et intègre dans sa définition actuelle toutes les formes non chimiques de contrôle des ravageurs des récoltes mais aussi des mauvaises herbes.

Les lieux de stockage représentent des systèmes stables, avec des niveaux déterminés de température et de l'humidité, parce qu'ils forment des enceintes closes, ce qui est favorable pour procéder à une lutte biologique.

L'utilisation des phéromones d'insectes attractifs et répulsifs d'alimentation est d'un haut niveau de détection. Ils peuvent être employés comme indicateur des époques d'application des méthodes de lutte contre certains ravageurs des denrées stockées.

Ainsi, la lutte par les insecticides botaniques est très recommandée, parmi les moyens mis en oeuvre par les plantes pour se défendre contre leurs déprédateurs, les médiateurs chimiques jouent un rôle déterminant [26]. Dans le bassin méditerranéen, on rencontre un très grand nombre de plante aromatique.

Son climat riche en luminosité et en chaleur, qu'accompagnent des saisons marquées, exige de la part des plantes des efforts adaptatifs favorable à une richesse moléculaire évolutive leur conférant de multiples propriétés, entre autre l'effet insecticide. [27]

2.10. Modification chimique des phénols (méthylation) :

2.10.1. Alkylation : synthèse d'éthers (méthylation)

2.10.1.1. Méthylation avec d'iodure de méthyl :

Les ions phénolate sont de meilleurs nucléophiles que les ions alcoolate bien que de basicité plus faible car la présence du cycle aromatique les rend très polarisables. L'alkylation des ions phénolate sur l'oxygène est un cas particulier de la synthèse de Williamson des éthers.

Avec un halogénure d'alkyle primaire, le mécanisme est de type SN2 et dans ce cas, la réaction est accélérée dans un solvant dipolaire aprotique (DMSO, DMF) qui solvate le contre-ion et exalte le caractère nucléophile de l'oxygène. [28]

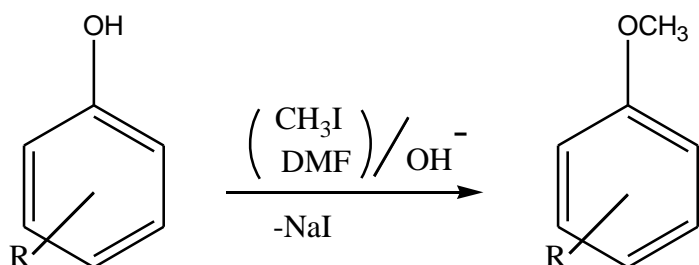
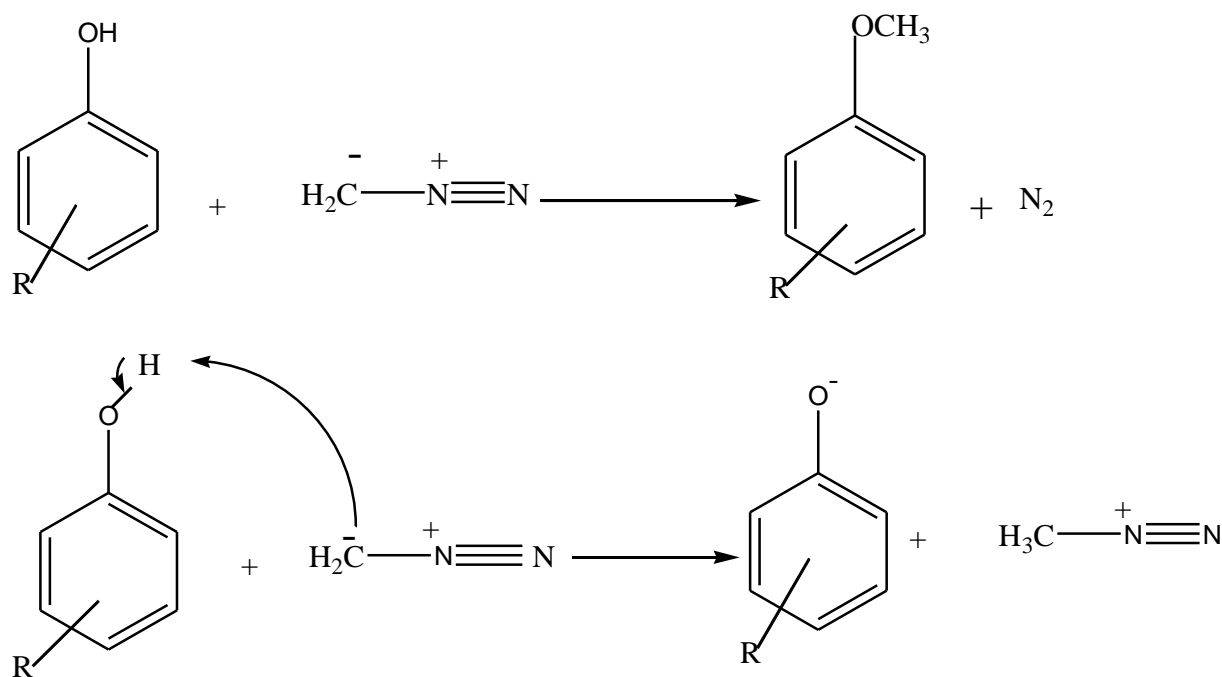


Schéma 01: réaction de méthylation des phénols avec d'iodure de méthyle

2.10.1.2. Méthylation avec le diazométhane : [29]



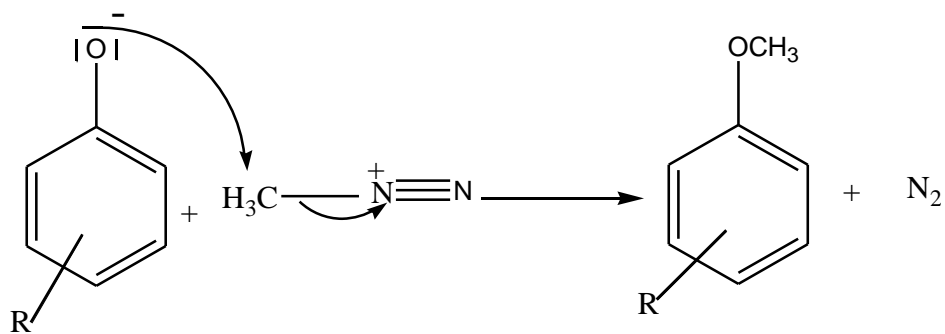


Schéma 02 : réaction de méthylation des phénols avec le diazométhane

2.10.1.3. Méthylation avec le diméthyle carbonate (DMC): [30]

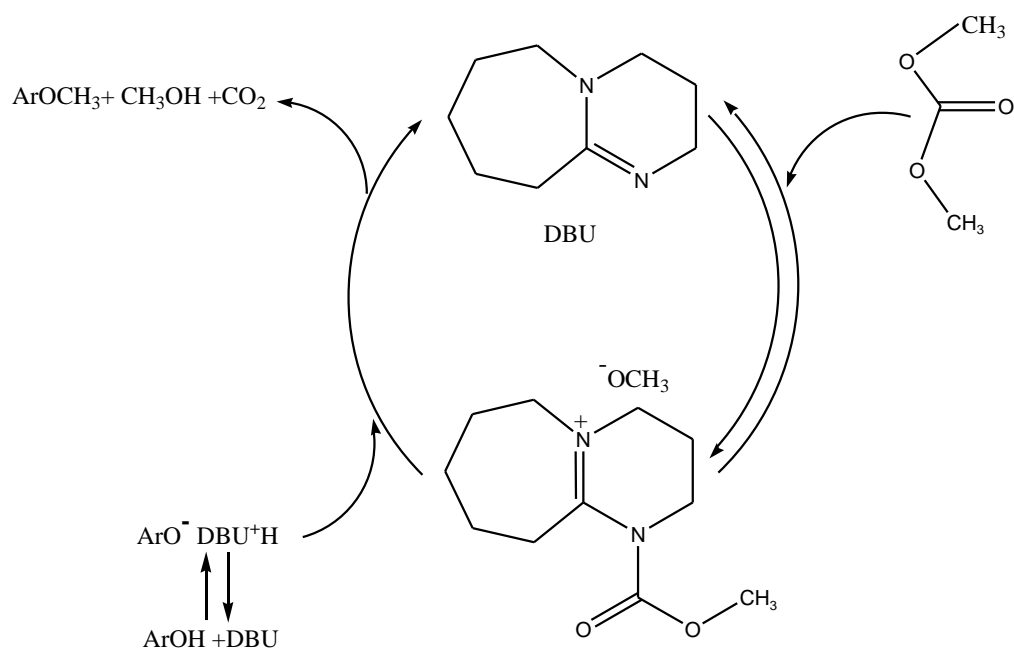
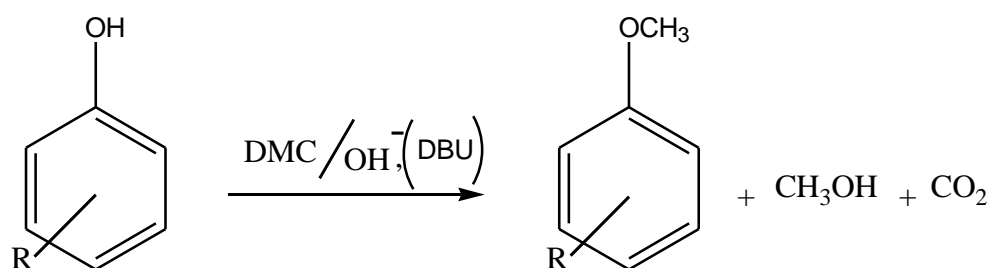


Schéma 03: réaction de méthylation des phénols avec diméthyle carbonate (DMC)

2.10.1.4. Méthylation avec le diméthyle sulfate (DMS): [28]

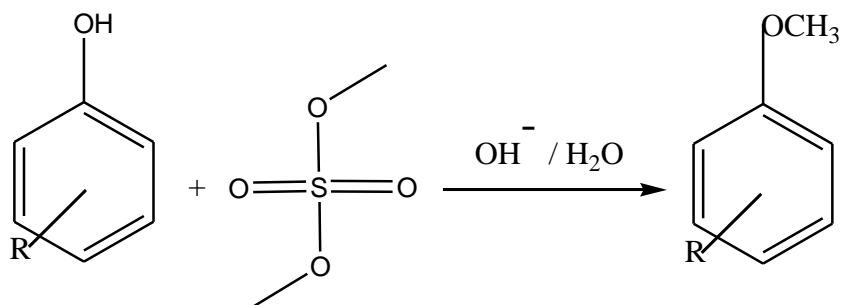
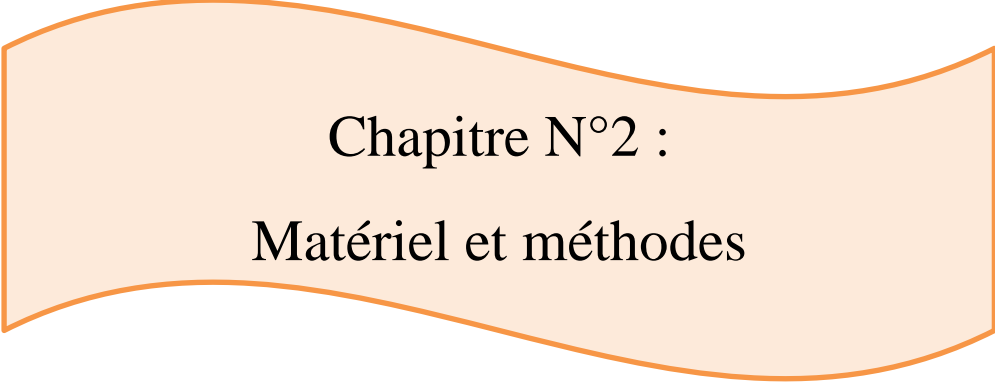


Schéma 04 : réaction de méthylation des phénols avec le diméthyle sulfate (DMS)



Chapitre N°2 :
Matériel et méthodes

3. Matériel d'étude :

3.1. Matériel non biologique :

L'ensemble de matériel non biologique est illustré dans l'annexe N°03

3.2. Matériel biologique :

3.2.1. Matériel animal :

L'espèce utilisée pour nos essais est l'adulte de *Sitophilus Oryzae* qui provient d'un élevage de masse de blé effectué au laboratoire de chimie organique d'université de Blida dans une étuve réglée à une température de 30°C et une humidité relative de 70%.

3.2.1.1. Aperçu général sur *Sitophilus oryzae*

3.2.1.1.1. Position systématique

L'insecte étudié est un petit Coléoptère appartenant au genre *Sitophilus* et à la famille de Curculionidae. Anciennement connu sous le nom de Calandra, il est maintenant, communément appelé charançon des grains (Figure 4 (1,2)).

Sitophilus est l'un des insectes qui attaquent et déprécient les grains du stockage. Il est considéré comme l'une des espèces les plus nuisibles des stocks dans les pays tropicaux. Il cause aux diverses céréales entreposées, des dégâts jugés importants. [31]

3.2.1.1.2. Origine et répartition géographique

Les espèces nuisibles aux céréales *Sitophilus oryzae* stockées du genre *Sitophilus*, sont devenues cosmopolites on les trouve dans le monde entier. En effet l'accroissement du trafic international et la nécessité de stocker des quantités considérables de grain, ont contribué fortement à la dissémination des charançons et autres prédateurs à travers les différents continents. [32]

Elle se multiplie sur le pourtour du bassin méditerranéen et cause de grands dégâts, à l'heure actuelle, il est répandu dans toutes les régions tropicales et sub-tropicales et il est considéré comme un fléau grave en Australie, en Amérique du sud, en Afrique du nord et sud, en Inde et Aux états unis. [33]

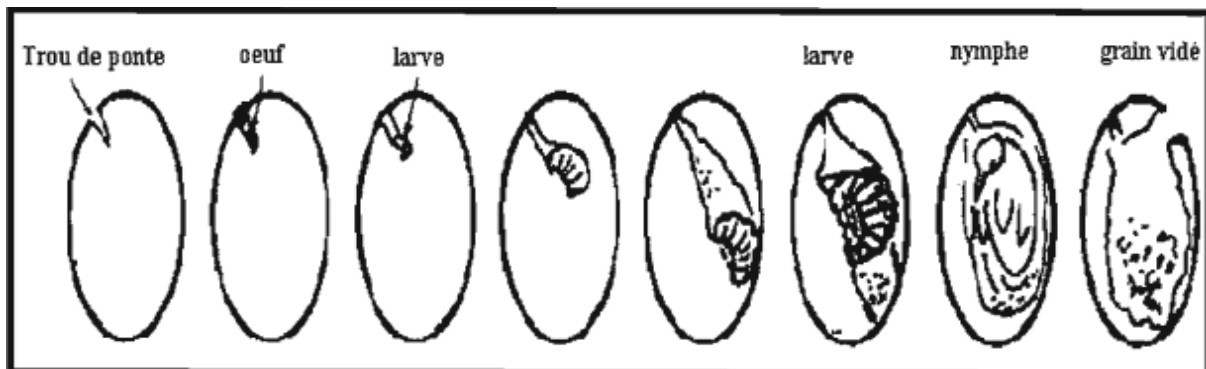


Figure 04: Développement de Sitophilus oryzae

Figure 04(1) : Larve de Sitophilus oryzae L.



Figure 04(2): Adulte de Sitophilus oryzae L.



3.2.2. Matériel végétal :

Notre étude a porté sur l'origan (*Origanum SP*), espèce appartenant à la famille des *labiées*. Le choix de cette plante est fait parce qu'il y a peu d'étude concernant cette espèce et aussi car elle possédé un effet antibactérien et antifongique puissant et riches en huile essentielle.

Les parties végétales utilisées pour extraire les huiles essentielles de l'origan sont les feuilles et les fleurs. Ces compartiments ont subi un séchage au préalable à l'air libre à l'abri de la température et de l'humidité, après séchage les différents compartiments de la plante ont été utilisés directement pour l'extraction.

❖ La récolte :

L'échantillon a été récolté, pendant la période de floraison, au mois de juin 2011, dans la région de Gouraya « commune Marsou » de la wilaya de Tipaza. Cette zone se situe à 40 Km de l'ouest d'Alger et se caractérise par un climat humide.

La récolte a été effectuée sur les parties aériennes (tiges et feuilles, sommités des fleurs).

❖ Le séchage :

Les parties de la plante fraîchement récoltées, ont été lavées à l'eau courante afin de les débarrasser des mauvaises herbes et de la poussière et autres particules.

Elles sont séchées à l'ombre à une température ambiante, dans un endroit aéré et sec pendant 20 jours afin de garder intacte les composés actifs de ces plantes, pour l'extraction des huiles essentielles. [34]

3.2.2.1. Origan (*Origanum glandulosum*) :

3.2.2.1.1. Classification :

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure synthétisée dans le tableau N°02 ci-dessous :

Tableau N° 02 : classification botanique de l'origan

<i>Régne</i>	<i>Plantae</i>
<i>Classe</i>	<i>Dicotylédones</i>
<i>Sous classe</i>	<i>Asteridae</i>
<i>Ordre</i>	<i>Lamiales</i>
<i>Famille</i>	<i>Lamiaceae</i>
<i>Genre</i>	<i>Origanum</i>
<i>Espèce</i>	<i>Origanum glandulosum</i>



Figure 03: la plante de l'origan sèche.

3.2.2.1.2. Description botanique

C'est une plante robuste herbacée appartient à la famille de lamiaceae pousse bien dans les sols calcaires. Les feuilles sont gris vert, et lisses .La fleur comporte un calice tubuleux non bilabié à cinq dents courtes, une corolle blanche à lèvre supérieure marginée et à lèvre inférieure trilobée et quatre étamines divergentes. Le fruit est un tétrakène presque rond et sans albumen. [35]

3.2. 2.2.Appareillage

Nous avons choisi entrainement la vapeur d'eau sèche comme méthode d'extraction des huiles essentielles de l'origan.

3.2.2.2.1. Extraction de l'huile essentielle par entrainement la vapeur d'eau sèche :

a. Principe :

L'échantillon d'huile essentielle de l'origan a été obtenu par entrainement à la vapeur d'eau :

La matière végétale découpée et pesée est disposée dans un ballon de 1litre qui est relié par un coude au réfrigérant de type serpentin. La vapeur d'eau produite dans chaudière, traverse la matière végétale et entraînent les molécules volatiles qui après condensation a été récupérée dans une ampoule à décanter. La phase organique a été récupérée et conservée dans des tubes opaques en verre.

Les conditions opératoires :

- Masse de la matière végétale sèche : 100g
- Température : 100C°



Figure 04: dispositif de l'entraînement à la vapeur d'eau

a. Détermination du volume d'huile essentielle:

A la fin des 90 min d'ébullition et après le refroidissement du mélange contenu dans le ballon, on détermine le volume de l'huile essentielle grâce aux graduations millimétriques de l'appareil utilisé. Les volumes obtenus sont exprimés en ml.

b. Détermination de rendement en huile essentielle :

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le volume de l'huile essentielle et le poids de matière végétale à l'état sec.

Par rapport à 100g de matière sèche:

Elles sont exprimées en pourcentage par rapport à 100g de matière sèche selon la formule suivante:

$$R_c(\%) = \frac{\sum_i^t m_i}{m} \times 100$$

Equation 01 : formule de calcul le rendement d'extraction l'huile essentielle de l'origan

R_c : Rendement d'huile essentielle en ml/100g;

m_i : Masse d'huile essentielle en g ;

m : poids de la matière végétal exprimé par rapport à la matière sèche (100g).

3.2.3. Modification chimique de l'huile essentielle de l'origan et thymol synthétique :

3.2.3.1. La méthylation de l'huile essentielle de l'origan :

Mode opératoire :

On met 5g d'huile essentielle de l'origan dans un ballon de 100 ml avec un réfrigérant, on ajoute 1,2 mol de KOH à 10%. On ajoute 1mol de DMS sous refroidissement en gardant la température en dessous de 40C°, après l'addition de DMS, le mélange est chauffée sur bain marie pendant 60min.

On a séché l'huile essentielle de l'origan méthyles par sulfate de sodium.

3.2.3.2. La méthylation de thymol synthétique :

Mode opératoire :

On met 5g de thymol poudre dans un ballon de 100 ml avec un réfrigérant, on ajoute 1.2 mol de KOH à 10%. On met dans un bain marie jusqu'à la solubilité total de thymol, en change le bain marie par un bain de glace pendant 15 min. On ajoute 1mol de DMS sous refroidissement en gardant la température en dessous de 40C°, après l'addition de DMS, le mélange est chauffée sur bain marie pendant 60min.

On a séché l'huile de thymol méthyles par sulfate de sodium.

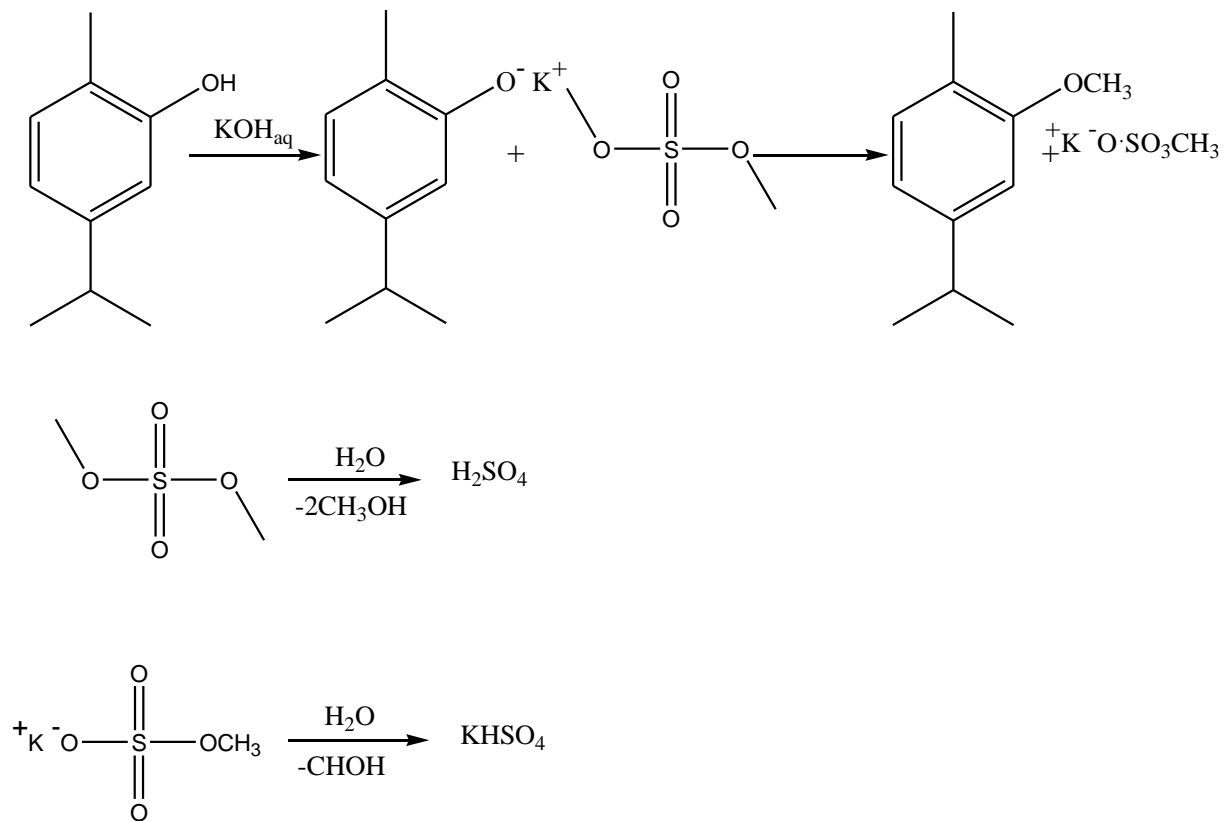


Schéma 05: réaction d'élimination les traces de DMS

3.3. Caractéristiques d'huile essentielle de l'origan avant et après la méthylation :

Dans cette partie on a suivi ces deux caractérisés nos échantillons :

- Déterminer les indices physiques et chimiques (indice de réfraction, indice d'ester, et indice d'acide).
- Obtenir les profils chromatographiques (CG/MS, CPG).

3.3.1. Caractérisation physico-chimique :

La qualité de l'huile essentielle et sa valeur commerciale sont définies par des normes admises et déterminées par plusieurs organisations connus à l'échelle mondiale, en fixant les conditions opératoires et en mettant au point des monographies pour la caractérisation des :ISO, AFNOR, et la pharmacopée.

3.3.1.1. Indice de réfraction :

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevée, il est supérieur à celui de l'eau distillée à 20C°=1.333 ceci grâce à leur richesse en composants qui devient la lumière polarisée. [36]



Figure 07 : réfractomètre

3.3.1.2. L'indice d'acide (I_A) :

L'indice d'acide I_A est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres un gramme de l'huile essentielle.

Principe :

Neutralisation des acides libres par une solution éthanœique d'hydroxyde de potassium titré.

Réactifs :

Au cours de l'analyse on utilise uniquement des réactifs de qualité reconnue et de l'eau distillée ou de l'eau de la pureté équivalente, éthanol à 96% à 20C°, rarement neutralisé par la solution d'hydroxyde de potassium, solution éthanœique titré, C(KOH)= 0.1mol/l.

Mode opératoire :

On introduit 1 g d'huile essentielle dans un ballon, on ajoute 25 ml d'éthanol et 5 gouttes de solution de phénolphaléine, comme indicateur et on neutralise la solution avec l'hydroxyde de potassium contenue dans la burette.

$$I_A = \frac{5.61 \times V}{m}$$

Equation 02: formule de calcul indice d'acide

Ou :

V : est le volume en millilitre de solution d'hydroxyde de potassium pour le titrage.

m : est la masse en gramme de la prise d'essai.

3.3.1.3. Indice d'ester :

L'indice d'ester I_E est le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des esters contenue dans 1 gramme d'huile essentielle.

Principe :

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

Réactifs :

Ethanol à 96% volumique.

C (KOH) = 0.5 mol/l

C (HCl) = 0.5 mol/l

Mode opératoire :

Dans un ballon on introduit 1 g d'huile essentielle, on ajoute à l'aide d'une burette 25 ml de la solution de KOH, on adapte un tube en verre ou un réfrigérant et on place le ballon sur le bain d'eau bouillante et on l'y laisse pendant une durée précisée dans la monographie de l'huile essentielle à analyser.

On laisse refroidir, on démonte le tube et on ajoute 20 ml d'eau puis 5 gouttes de solution de phénolphtaléine, comme indicateur. On titre l'excès d'hydroxyde de potassium avec une solution d'acide chlorhydrique.

$$I_E = \frac{28.05}{m} (V_0 - V) - I_A$$

Equation 03: formule de calcul indice d'ester

Ou :

V_0 : Le volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique dans le test blanc.

m : est la masse en gramme de prise d'essai (1g).

I_A : La valeur d'indice d'acide, déterminé selon NFF 75-103.

3.3.2. Analyse des huiles essentielles par les méthodes chromatographiques :

3.3.2.1. La Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

Depuis plus trentaine d'années la CPG. C'est développée irrésistiblement .Elle est devenue une méthode de choix pour la séparation d'un mélange complexe de produit volatils. A l'aide de la C.P.G, les mélanges très complexes de substances volatiles peuvent être séparés, identifiés et quantifiés dans un temps relativement bref.



Figure 06: chromatographie en phase gazeuse (CPG)

b. Conditions d'analyse chromatographique (polaire):

Appareillage	CPG
Type de colonne	F9-OV-1701-CDmoyennement polaire
Injection split	5 μ l
Gaz vecteur	Azote (N2)
Pression	80 mpa
Température de l'injection	220 c°
Température du détecteur	260c°
Durée d'acquisition	59min
Volume injecté	0.05 μ l
Début	20 ml/min
Colonne	40c°isotherme 2min allé jusqu'à 260c°avec une vitesse de chauffage 5degré par min à la fin isotherme 6 min

Tableau N°03: condition opératoire de CPG (colonne polaire)

3.3.2.2. Analyse par spectrométrie infrarouge (IR) :

L'objectif de cette manipulation est de caractériser la composition présente dans les différents échantillons de huile pour cela, on mène des études spectroscopiques infrarouge pour connaître leur fonction analyse quantitative.

L'analyse par spectrométrie infrarouge est principalement basée sur l'étude des vibrations d'élongations et de formation.

On a utilisé un spectrophotomètre FTIR à transformée de fourrier de marque Shimadzu 8900, pour effectuer des mesures d'échantillon solide, il faut préparer une pastille.

Les spectres sont enregistrés à température ambiante à l'aide d'un spectrophotomètre piloté par un ordinateur grâce au logiciel spécial.

3.3.2.3. La Chromatographie en phase gazeuse couplés par spectre de masse (CG/MS) :

➤ Couplage CG/MS :

Nos échantillons d'HE méthyles ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse

Couplé au spectromètre de masse (CG/MS), fait au niveau de laboratoire central de police scientifique

➤ Conditions opératoires:

Chromatographie phase gazeuse(CPG) :

- ✓ Température injecteur: 250 C
- ✓ Volume d'huile injecté : 2 µl
- ✓ Gaz vecteur: Hélium ultra pur 1 ml/mn
- ✓ Colonne: PE, Elite série 5%phenyl diméthyle polysiloxanne
- ✓ Longueur: 30 m
- ✓ Diamètre interne: 0.25 mm
- ✓ Epaisseur de la phase stationnaire: 0.25 µm

Programmation de la température:

- ✓ T initiale: 60 C
- ✓ Rampe1: 15 C/mn jusqu'a 150 C
- ✓ Rampe 2: 5 C/mn jusqu'a 275 C, pendant 24 mn
- ✓ Temps d'analyse: 55 mn

Spectrométrie de masse (MS) :

- ✓ Ionisation: Impact électronique 70 ev
- ✓ Mode: Balayage 80 - 600 uma
- ✓ Analyseur: quadripole
- ✓ Décali de solvant: 5.90 mn

3.4. Séparation de thymol et carvacrol à partir de l'huile essentielle de l'origan :

Mode opératoire :

Verser dans une ampoule à décanter 10.0 g d'huile essentielle et ajoute la quantité nécessaire d'une solution de NaOH à 25%(10.64g de l'eau distillé+2,7gde NaOH). Agiter énergiquement le mélange et laisser reposer 24h pour la séparation complète de la phase aqueuse .cette phase contient le thymolate de sodium qui doit être traité par une solution d'acide fort (acide chlorhydrique 37%).

On a obtenu deux phases dans ce cas nettoyé par l'eau distillé plusieurs fois pour éliminer les traces de NaOH et acide chlorhydrique.

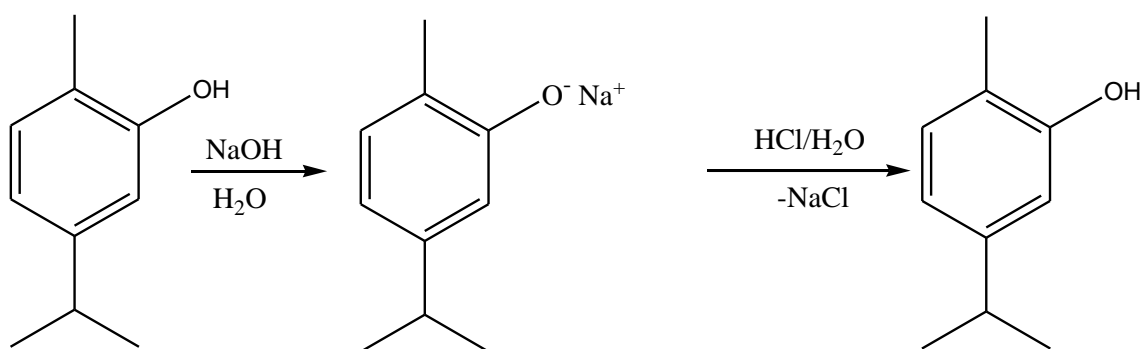


Schéma 06: réaction de séparation de carvacrol

3.5. L'évaluation de l'activité antioxydante :

3.5.1. Réaction du fer : FRAP (ferric reducing antioxidant power) :

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe²⁺, la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) en couleur bleu vert du fer ferreux(Fe²⁺), l'intensité de cette coloration est mesuré par spectrophotométrie à 718 nm.

Le protocole expérimental utilisé est: 0.5 ml de l'échantillon à différentes concentrations, est mélangé avec 1.25 ml d'une solution tampon Phosphate à 0.2M (pH= 6.6) et 1.25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) à 1%. Le tout est incubé à 50 C° pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante.2.5ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, à la fin ont ajouté 250µl d'une solution de chlorure de fer

(FeCl₃, 6H₂O) à 0.1%. la lecture des absorbances se fait contre un blanc (acide ascorbique) à 701nm à l'aide un spectrophotomètre. [37]

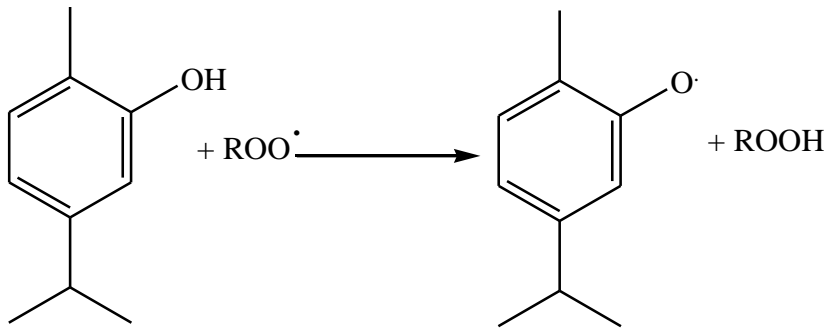


Schéma 07: Réaction du carvacrol avec un radical peroxyde

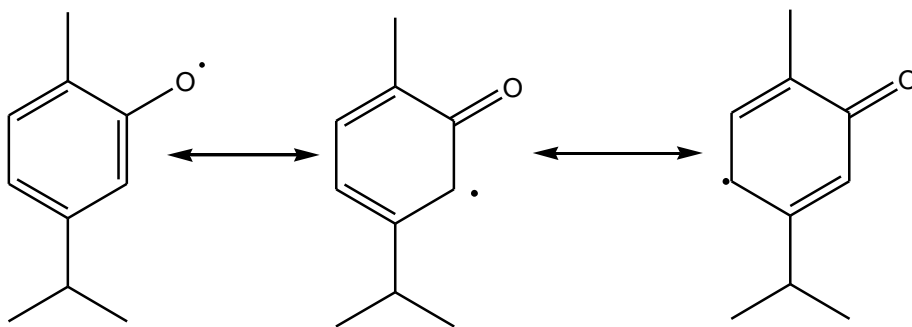


Schéma 08 : Stabilisation du radical formé par résonance

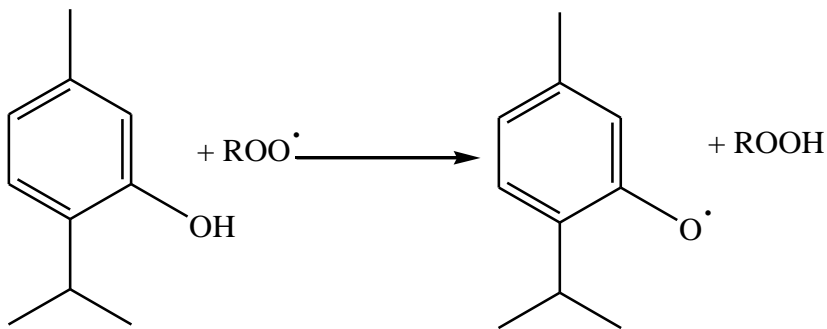


Schéma 09 : Réaction du thymol avec un radical peroxyde

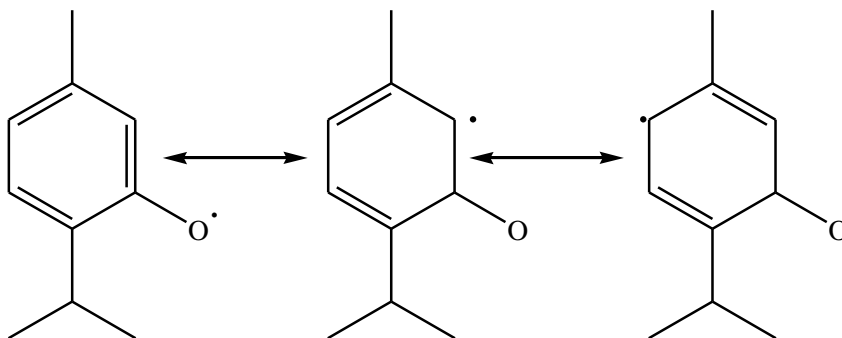


Schéma 10 : Stabilisation du radical formé par résonance

3.5.2. Piégeage du radical libre DPPH :

Pour étudier l'activité anti radicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm.

Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites antioxydants afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (déphényl picryl-hydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 516 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance. [38]

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100ml de méthanol ($40\mu\text{g/mL}$). 0.5mg de l'échantillon à différentes concentrations ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 100ml de l'éthanol, on a pris différentes concentrations (10ml, 20ml, 30ml, 40ml, 50ml, 60ml) de différent échantillon ou standard (acide ascorbique) en a ajouté 1ml de DPPH et 1ml de l'éthanol, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 516nm. l'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous : [39]

$$\%d'activité\ antiradicalaire = \frac{Abs\ controle - Abs\ échantillon}{Abs\ controle} \times 100$$

Equation 04: formule de calcul %d'activité anti-radicalaire

Calcul des IC_{50} :

IC_{50} (Concentration inhibitrice de 50%), aussi appelée $EC50$ (Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les $IC50$ sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés. [40]

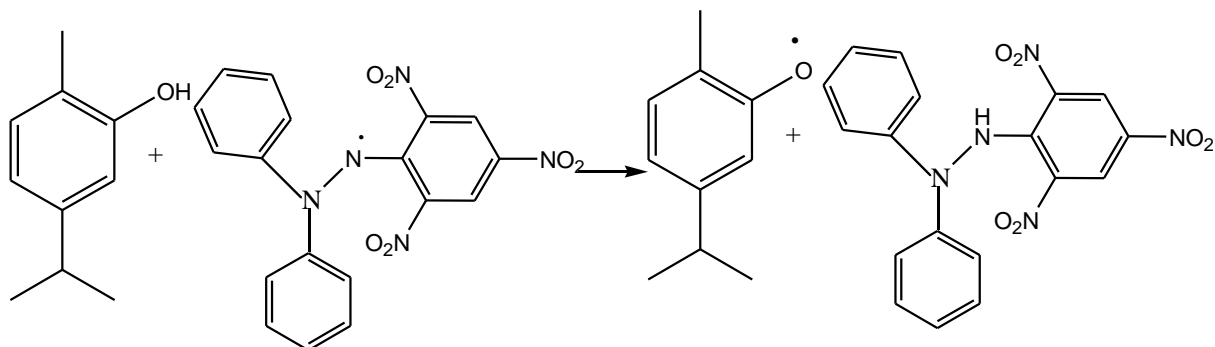


Schéma 11 : Réaction du carvacrol avec un radical DPPH

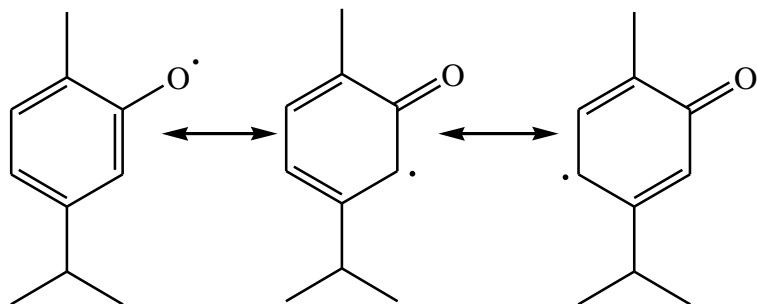


Schéma 12 : Stabilisation du radical formé par résonance

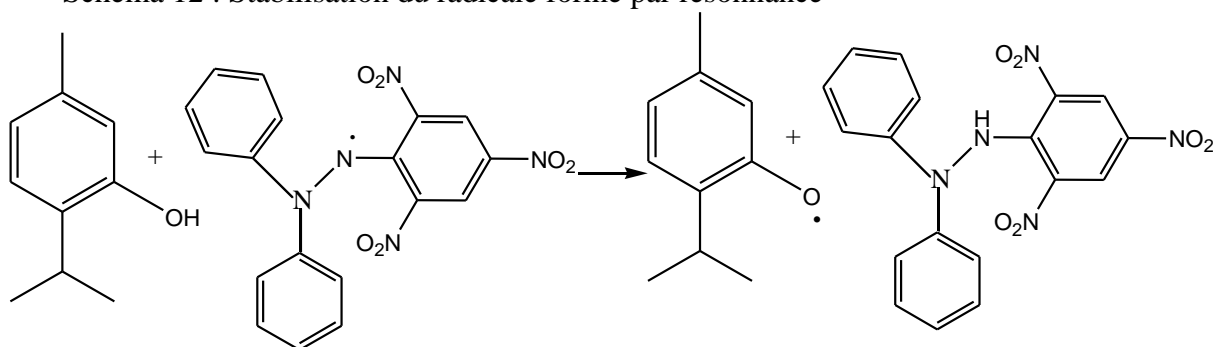


Schéma 13 : Réaction du thymol avec un radical DPPH

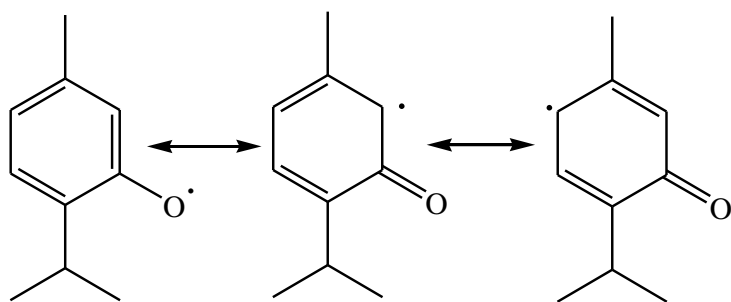


Schéma 14 : Stabilisation du thymol formé par résonance

3.6. Application de l'huile essentielle sur les charançons de blé :

La méthode d'application d'insecticide est variée et elle dépend surtout la nature de l'insecte et celle du produit à protéger. Dans notre cas nous avons opté pour une méthode d'application : par contact (pulvérisation) et par fumigation (inhalation).

A partir des huiles essentielles obtenues, nous préparons les doses à tester après dilution dans le tensioactif tween 80(diluée 1%).

Nous avons utilisé le tween 80 à la dose 1% comme témoin à cause de l'absence de l'activité insecticide et comme diluant pour former des microémulsions et donc l'homogénéisation de solution de la solution d'huiles essentielles pour obtenir des résultats reproductibles.

Afin d'évaluer l'effet insecticide des huiles essentielles, nous avons choisi le mode d'action par contact et par fumigation, nous avons versé différentes doses sur les insectes de charançon de blé .cette opération effectuée par un pulvérisateur manuel, d'une capacité 1mL avec les doses D1, D2, D3 et D4.Pour chaque dose nous avons effectués trois répétitions, Pour la mortalité : le nombre d'insectes morts est compté après 24h, 48h et 72h.

3.6.1. Préparation des doses des huiles essentielles

A partir des huiles essentielles obtenues, nous préparons les doses à tester après dilution dans le tween 80(diluée 1%).

Pour ces substances nous avons utilisé les doses suivantes :

- première dose ; 1g de H E +99 ml solution de Tween.
- 2^{ème} dose ; 0.5 g de H E +99.5 ml de Tween.
- 3^{ème} dose ; 0.25g de H E +99.75 ml de Tween.
- 4^{ème} dose : 0.125g de HE + 99.875 ml de tween.
- Témoin : 1g de tween 80 diluent dans 100ml de l'eau distillée pour obtenu solution de tween (1% diluée).

3.7. Evaluation de l'activité insecticide de l'huile essentielle

3.7.1. Test d'efficacité par contact

La méthode de l'imprégnation de papiers filtres a été utilisée pour évaluer la toxicité des huiles par contact.

- Des papiers filtres de 9 cm de diamètre sont imprégnés chacun de 1ml d'une solution d'huile essentielle d'une concentration donnée. (Témoin imprégné avec tween (1%))
- Les papiers filtres sont placés dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre et de 1 cm de hauteur. Dans chaque boîte sont déposés 22 individus de l'insecte étudié.
- La mortalité des insectes est évaluée 24h, 48h et 72h après traitement.

3.7.1.1. Exploitation des résultats

3.7.1.1.1. Correction de la mortalité

L'efficacité d'un produit biocide est évaluée par la mortalité de l'organisme cible. 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 traitée une mortalité naturelle qui vient s'ajouter à la mortalité provoquée par le toxique, pour cela les pourcentages de mortalité doivent être corrigés par la formule de Schneider- Orelli qui est la suivante :

$$M_c = \frac{M - M_t}{100 - M_t}$$

Equation 05: formule de calcul pourcentage de mortalité corrigé

M_c : Pourcentage de mortalité corrigé

M : Pourcentage de morts dans la population traitée

M_t : Pourcentage de morts dans la population témoin

3.7.1.1.2. Calcul des doses létales DL50

L'efficacité d'un toxique se mesure par la DL50 qui représente la quantité de substance toxique qui entraînant la mort de 50% d'individus d'un même lot. Elle est déduite à partir de trace la droite de régression .pour cela les pourcentages de mortalité corrigée sont transformés en probits selon le tableau N° 04 suivant :

Tableau N° 04 : les pourcentages de mortalité corrigée sont transformés 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

Ces probits sont représentés graphiquement en fonction de logarithme népérien afin d'évaluer la dose létale 50(DL50) pour l'essai contact et pour l'essai inhalation de chaque produits (huile essentielle, huile essentielle méthyles, thymol et thymol méthyles).

Ces trois doses sont déterminées à partir de l'équation d'une droite obtenue théoriquement

On déterminera la dose qui correspond à un probit de 5 (50% de mortalité) d'où la DL50.

Exemple de calcul des probits

- Si $M_c = 83.95\%$

$83\% \rightarrow \text{Probits} = 5.95$

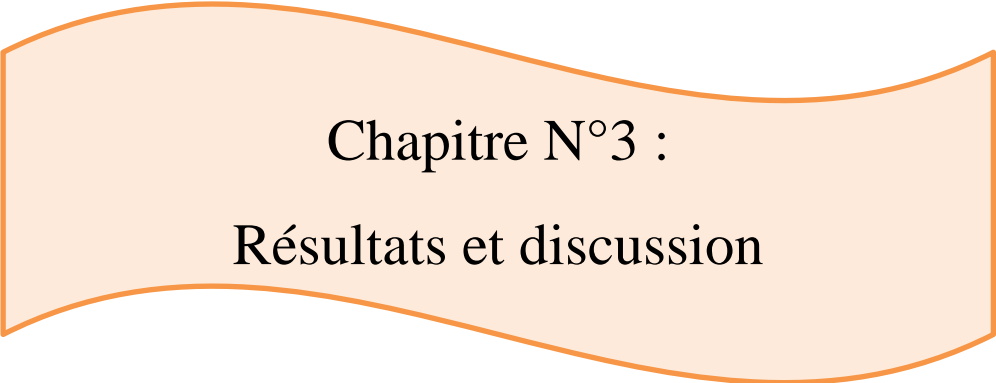
$83.95\% \rightarrow \text{Probits}_x$

$84\% \rightarrow \text{Probits} = 5.99$

$$\text{Probits}_x = 5.99 - \frac{84 - 83.95}{84 - 83} \times (5.99 - 5.95) = 5.988$$

3.7.2. Test d'efficacité par inhalation :

- des morceaux de cotons sont imprégnés par 1ml d'une solution d'huile essentielle avec concentration donnée.
- Les cotons sont placés dans des boites de 5 cm de diamètre et de 10 cm de hauteur à condition qu'il n'y a aucun contact avec les insectes .chaque boite contient 20 individus de l'insecte étudié est fermé hermétiquement.
- La mortalité des insectes est observée 24h, 48h et 72h après traitement des insectes.



Chapitre N°3 :
Résultats et discussion

4.1. Etude du rendement de l'extraction de l'huile essentielle

Le suivi de l'évolution de la quantité d'huile essentielle d'origan obtenu par entraînement à la vapeur d'eau a permis de compléter le tableau suivant représentant le rendement cumulé en fonction du temps.

Tableau N°05 : Rendement cumulé de l'huile essentielle de l'origan en fonction de temps.

t (min)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
R _c (%)	0	0.5	0.9	1.3	1.8	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2

La représentation graphique de la variation du rendement cumulé en huile essentielle d'origan en fonction du temps est schématisée par une courbe à deux paliers. Le premier palier de la courbe est une droite de la forme $y=a.x$. Dans ce domaine l'extraction est réalisée avec une vitesse constante du premier ordre et toute la quantité d'huile essentielle est extraite durant cette étape. Et deuxième palier est une droite parallèle à l'axe des abscisses de la forme $y= \text{constante}$ et qui indique la fin de l'extraction.

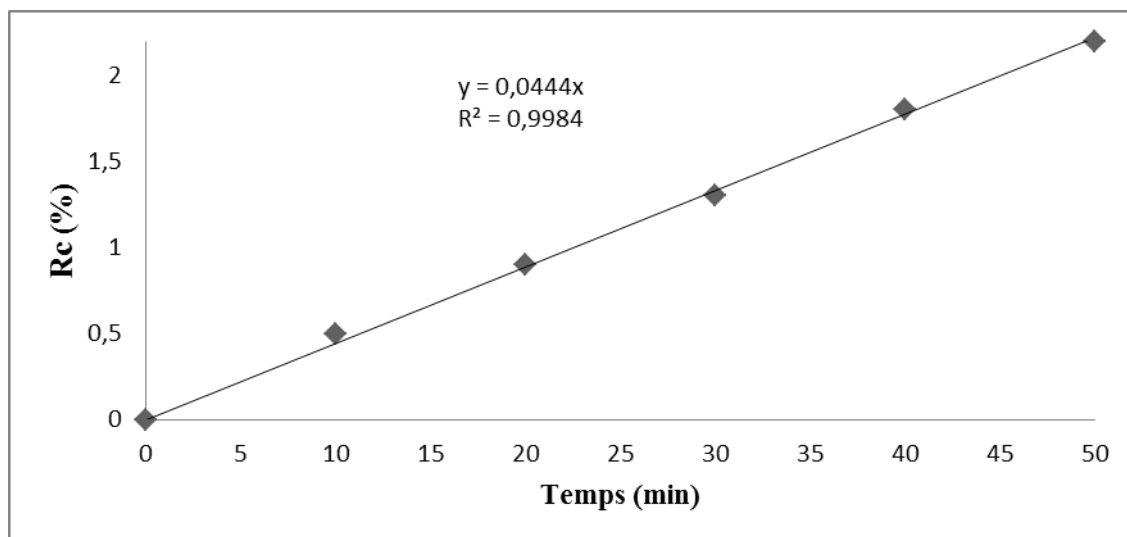


Figure 09 : courbe de rendement de l'huile essentielle de l'origan

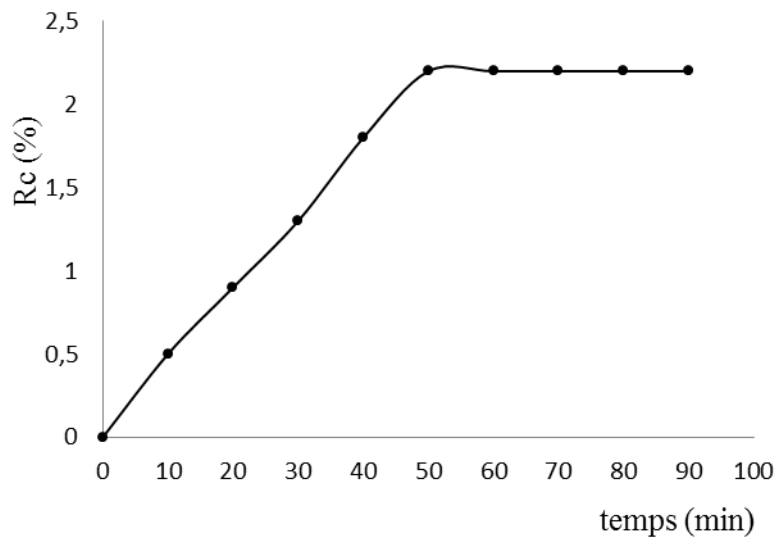


Figure 10: Rendement de l'huile essentielle de l'origan

Discussion des résultats :

- L'étude cinétique de l'extraction de l'origan par entraînement à la vapeur d'eau permet de comprendre et de déterminer le temps d'épuisement de la matière végétale en l'huile essentielle.
- L'épuisement en huile essentielle est entrent au bout de 50 min ce temps est intéressant en comparaisant avec les temps d'extraction citée dans la littérature qui sont de l'ordre de 90 à 120 min il faut ajouter aussi que le rendement qui est de l'ordre de 2%.

4.2. Etude analytique :

4.2.1. Détermination des indices physico-chimiques :

La détermination des indices physico-chimiques de différentes substances sont déterminées d'après la norme AFNOR, les résultats sont regroupés dans le tableau N°06 :

Tableau N°06: les indices physico-chimiques de L'huile essentielle d'origan, l'origan méthyles, et thymol.

Les substances indices	THM	HE	HEM
IA	3.93	14.02	1.68
IE	158.76	28.05	104.91
n_D^{20}	1.510	1.508	1.502

Discussion des résultats :

- Les valeurs de l'indice de réfraction 1.508 obtenue pour l'huile essentielle de l'origan est très élevée en comparaison avec celui de l'eau distillée qui de l'ordre de 1.333 cette différence montre la richesse de l'huile essentielle en composés chimiques.
- Ce pendent l'in traduction d'un groupe et méthyle dans les composés phénoliques des huiles essentielle réaction avec le DMS n'influe pas sur les valeurs de l'indices de réfraction.
- Ce résultat conformé la qualité de la modification chimique, la méthylation du thymol a permis de conformer les valeurs de l'indice de réfraction obtenu par l'huile essentielle de l'origan.
- L'indice de l'ester est le double de celui de l'indice d'acide de l'huile essentielle de l'origan 14.02. Cette valeur est attribuée à la composition en acide libre est particulièrement les phénols.
- La méthylation de l'huile essentielle de l'origan a permis de réduire considérablement les valeurs de l'indice qui passe de 14.02 à 1.68.
- Cette observation est conformé par l'augmentation de la valeur de l'indice d'ester qui passe de 28.05 à 104.91. Cette grande valeur de l'indice de l'huile essentielle méthyles

justifie la diminution de la densité par le remplacement de l'hydrogène de fonction phénol par un groupement méthoxy.

4.2.2. Méthode d'analyse chromatographique en phase gazeuse (C P G):

Cette analyse a été effectuée au laboratoire de méthode et analyse au département de chimie industrielle d'université de BLIDA, selon les conditions opératoires suivantes :

- La chromatographie en phase gazeuse (CPG) : (colonne polaire OV 17)

4.2.2.1. Identification des substances chimiques de thymol et thymol méthyles :

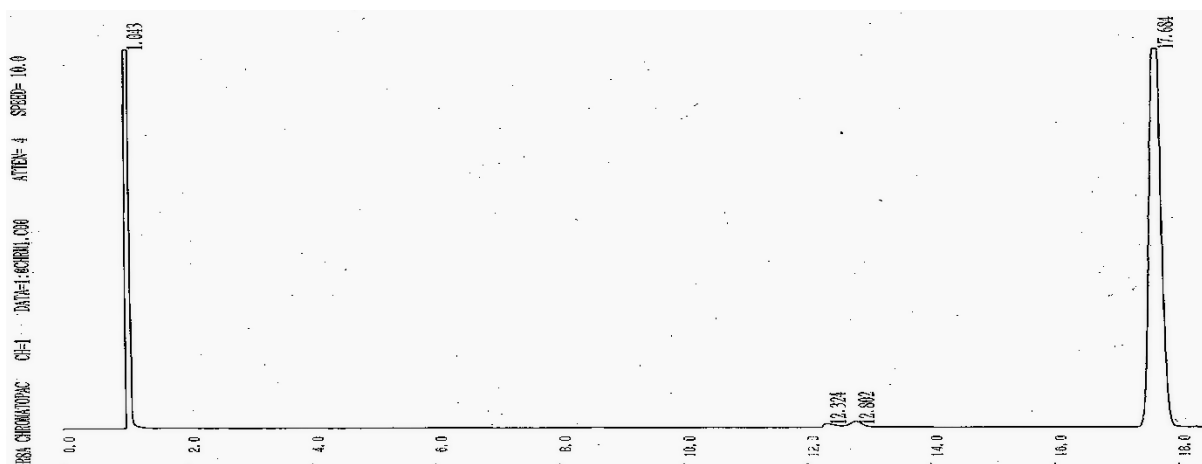


Figure 11 : chromatographique phase gazeuse de thymol

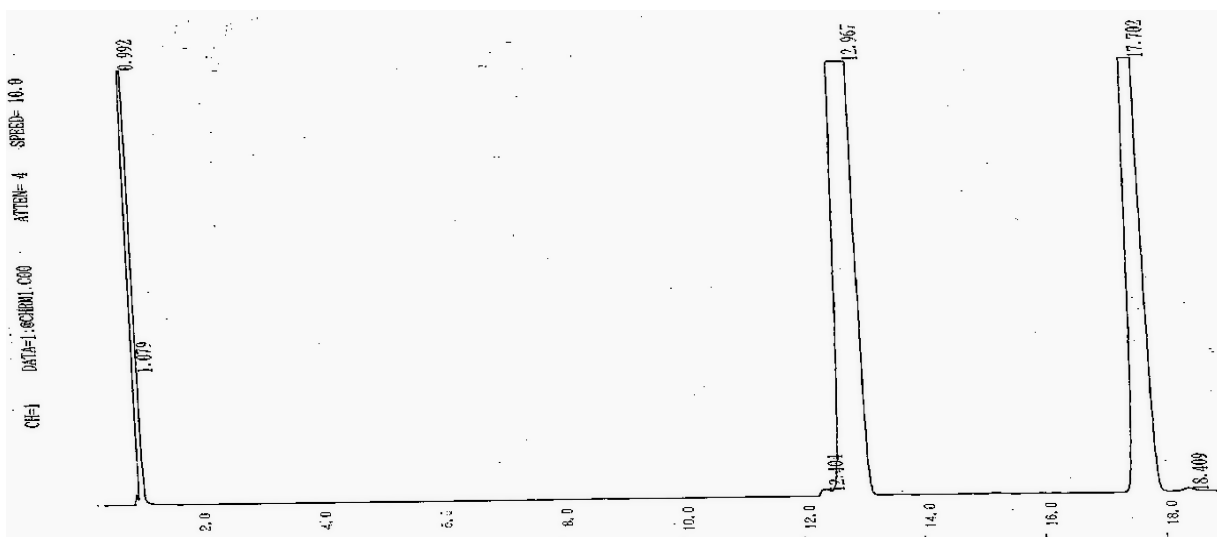


Figure 12: chromatographique phase gazeuse de thymol méthyles

4.2.2.3. Identification des substances chimiques de l'huile essentielle d'origan sans les composés phénoliques, et thymol et carvacrol séparés:

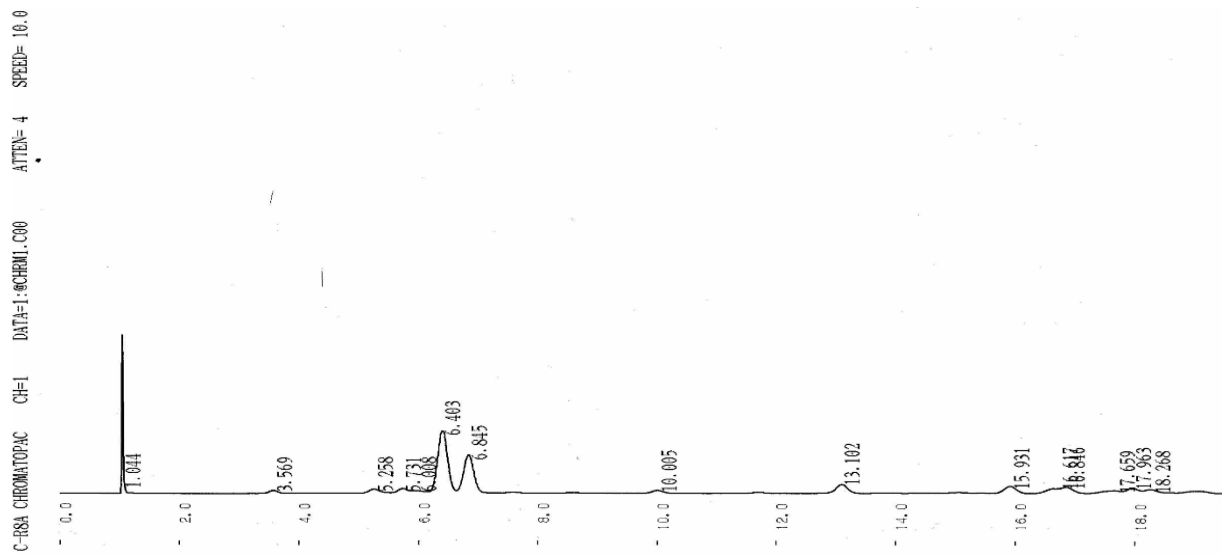


Figure 13: chromatographique phase gazeuse de l'huile essentielle de l'origan sans les composés phénoliques

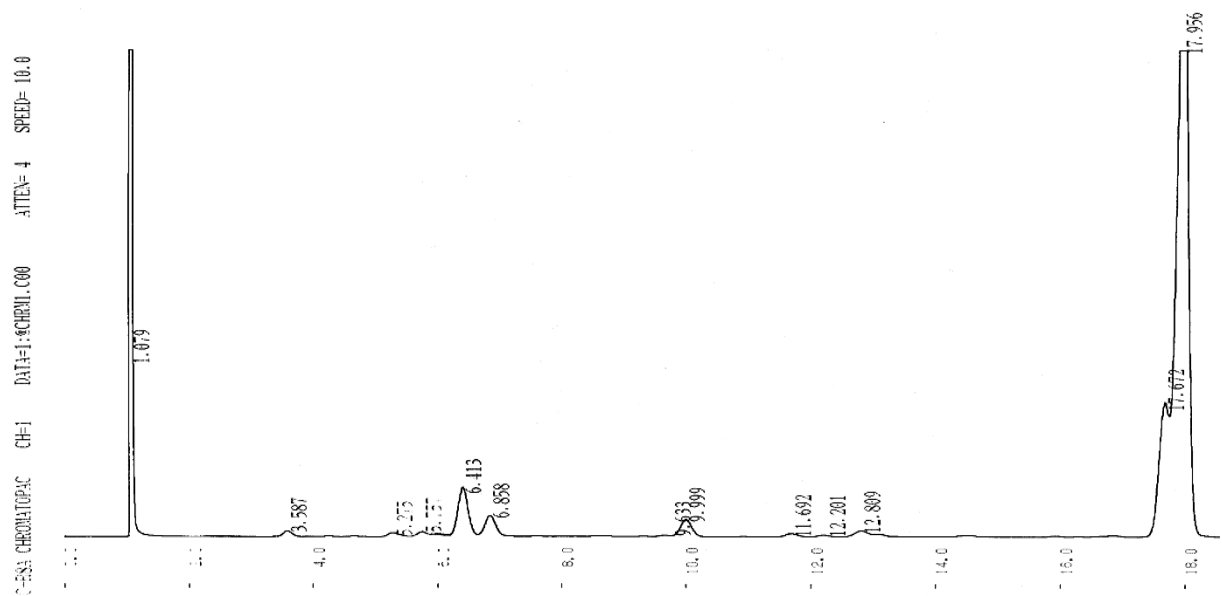


Figure 14: chromatographique phase gazeuse de thymol et carvacrol séparé

4.2.2.2. Identification des substances chimiques de l'huile essentielle d'origan et l'huile essentielle d'origan méthyles :

L'identification des composants chimique de l'huile essentielle d'origan et huile essentielle d'origan méthyles réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse.

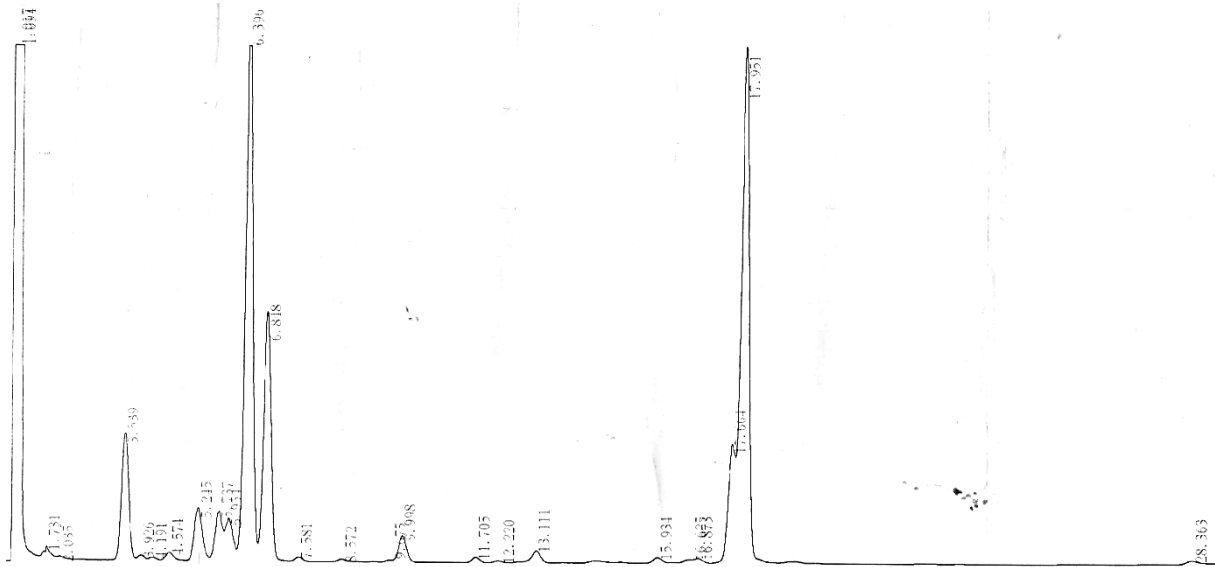


Figure N°15: chromatographique phase gazeuse de l'huile essentielle d'origan

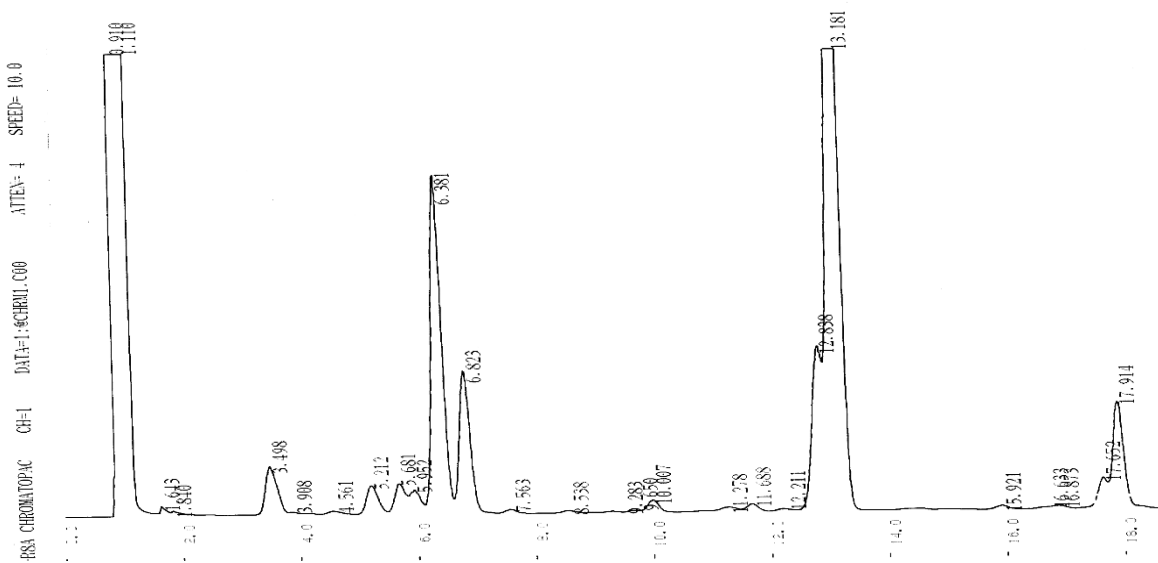


Figure N°16: chromatographique phase gazeuse de l'huile essentielle d'origan méthyles

Discussion des résultats:

- L'utilisation de la colonne polaire OV17 a permis de distinguer le thymol à l'état pur à 17.7 min. ce pendant la méthylation de ce dernier a été réalisé avec succès.
- Sa mise en évidence a rendu possible grâce à l'apparition d'un pic clair à 12.6 min relatif au thymylate de méthyle.
- D'après les résultats qui il est obtenu par l'identification des composés chimique de thymol et carvacol séparés à partir d'huile essentielle de l'origan, il est permis de distinguer le pic de thymol à 17.7 min, cette résultat elle est identique avec l'identification de thymol à l'état pur, et le pic 18 min responsable à la présence de carvacrol.
- L'huile essentielle de l'origan est caractérisée par la teneur élevée en certains éléments. Le chromatogramme de l'huile essentielle de l'origan démontre sans ambiguïté que cette espèce se caractérise par un pic clair de thymol à 17.7 min et le second pic clair correspond au carvacrol à 18 min.

4.2.3. Analyse l'huile essentielle de l'origan méthyles par CG-MS :

Les résultats de l'analyse de la composition d'huile essentielle de l'origan méthyles testé sont obtenus par comparaison des données de la masse des spectre et des temps de rétention et elle a permis d'obtenir le chromatogramme représenté dans la figure16 .

, 04-Jun-2012 + 23:34:29

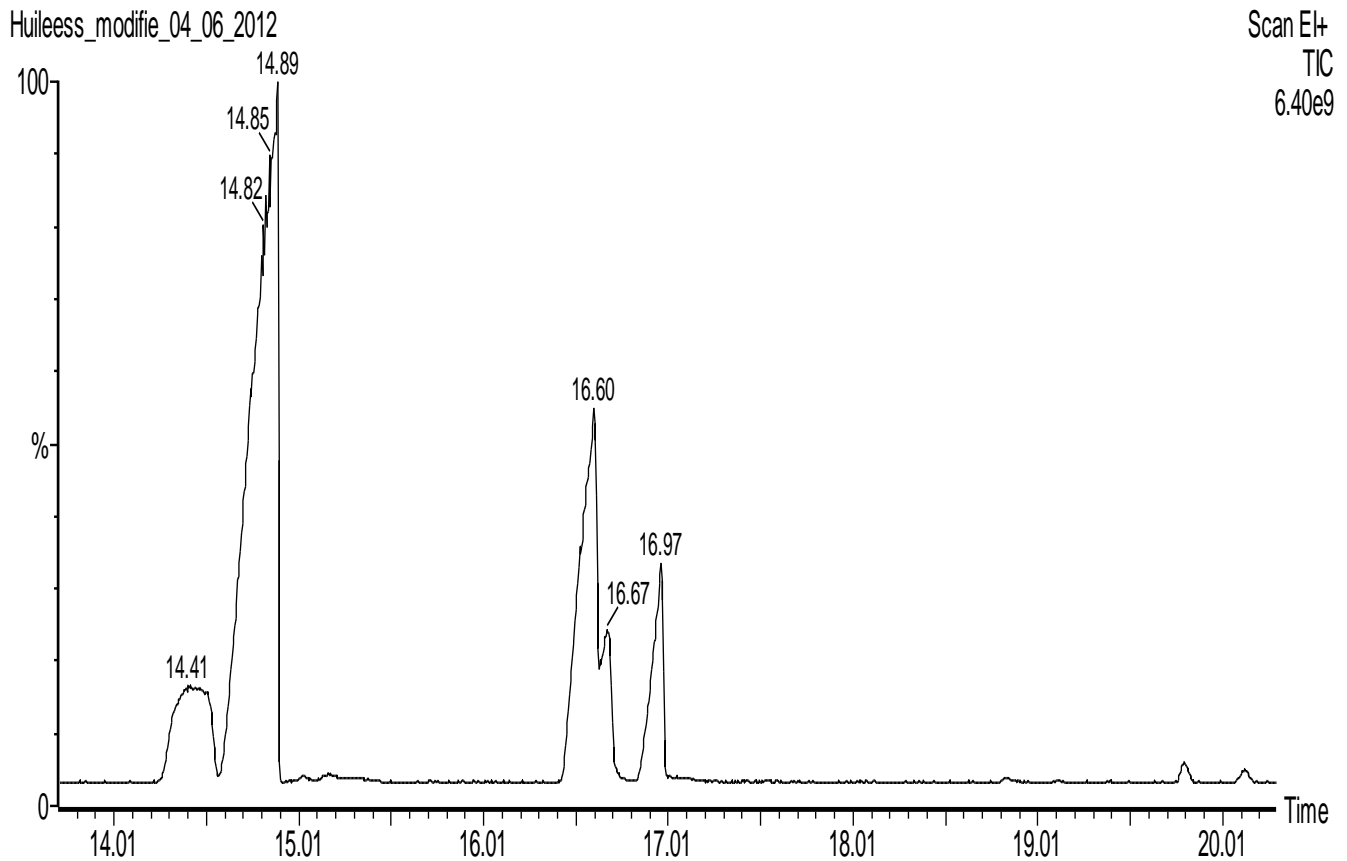
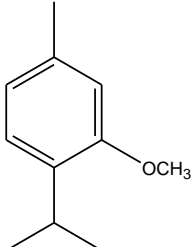
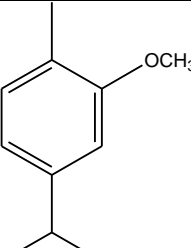
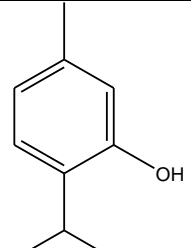
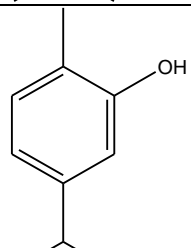


Figure 17 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de l'origan méthyles par CG/MS

L'examen du chromatogramme figure révèle la présence des substances correspondant à des pics, seule quatre pics d'entr eux ont peu être identifiés sont représentés dans le tableau ci-dessous et dans l'annexe N°02.

Tableau N°07: les principaux constituants de l'huile essentielle d'origan méthyles analysée par CG/MS.

Nom de composé chimique	Formule brute	TR (min)	Structure chimique
Thymylate de méthyle	$C_{12}H_{16}O$	14.41	
Inconnu	-	14.82	-
Carvacrylate de méthyle	$C_{12}H_{16}O$	14.85	
Inconnu	-	14.89	-
Inconnu	-	16.60	-
Thymol	$C_{10}H_{14}O$	16.67	
Carvacrol	$C_{10}H_{14}O$	16.97	

- : composé non identifié

Discussion des résultats :

- Le chromatogramme de l'huile essentielle de l'origan méthyles détecté quatre composé reconnus de temps rétention (14.41min, 14.85min, 16.67min, et 16.97min).
- D'après les résultats obtenus dans le tableau, l'huile essentielle de l'origan est constituée de composée phénolique dominés par la présence du : thymol, carvacrol, thymylate de méthyle et carvacrylate de méthyle.
- Les résultats obtenus conformes la réaction de méthylation de l'huile essentielle de l'origan par les composées suivante : thymylate de méthyle et carvacrylate de méthyle de tems de rétention (16.67min et 16.97min).

4.2.4. Analyse par spectrométrie infrarouge (IR) :

L'identification des nôtres échantillons (poudre de TH et l'huile de THM, l'HE de l'origan, et l'HEM), de la substance organique s'est réalisée par la vibration de l'identité de chaque bande du spectre, connaissant la fréquence de vibration de la liaison.

Observation :

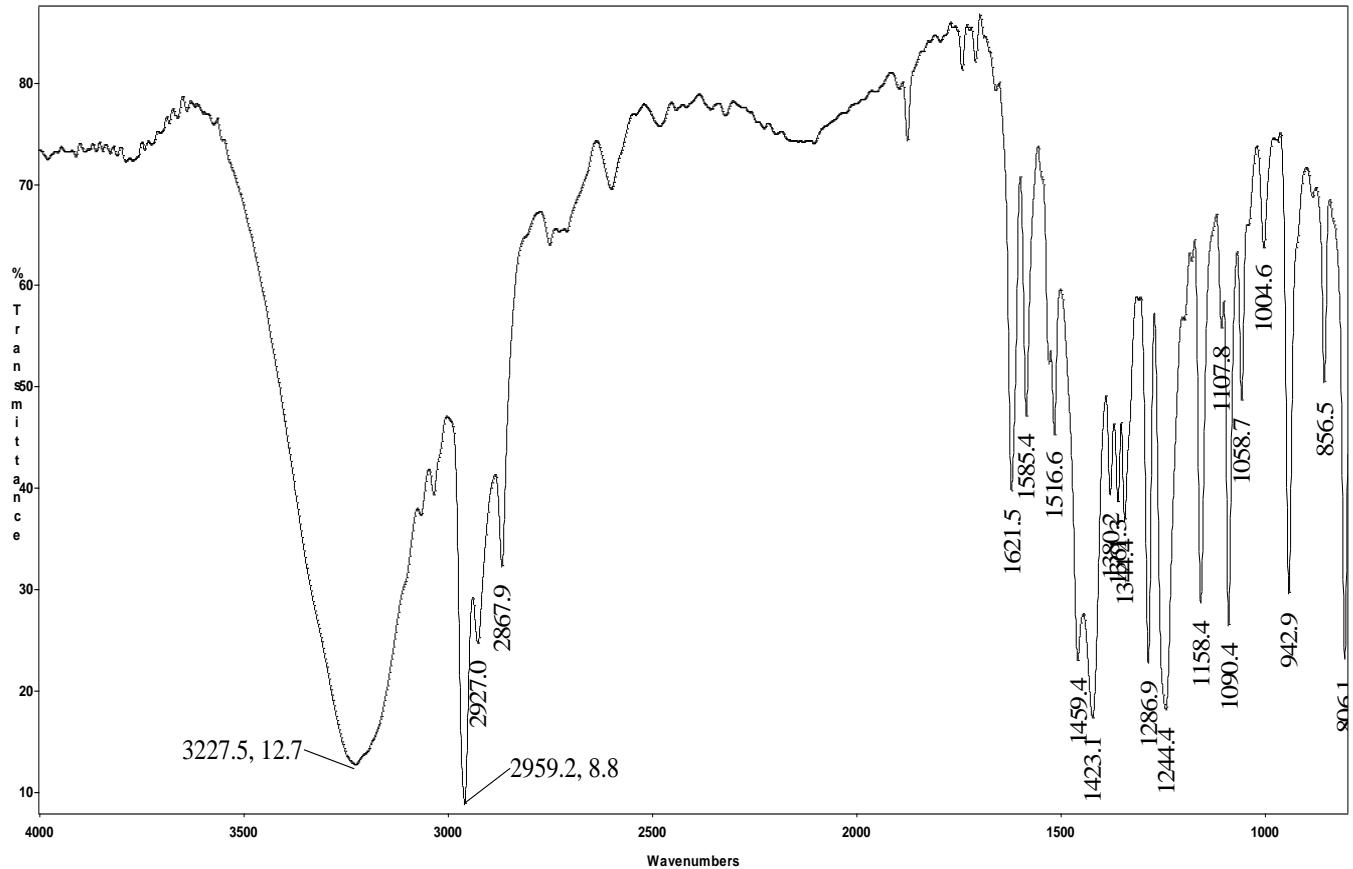


Figure 18: spectre IR de thymol

Observation :

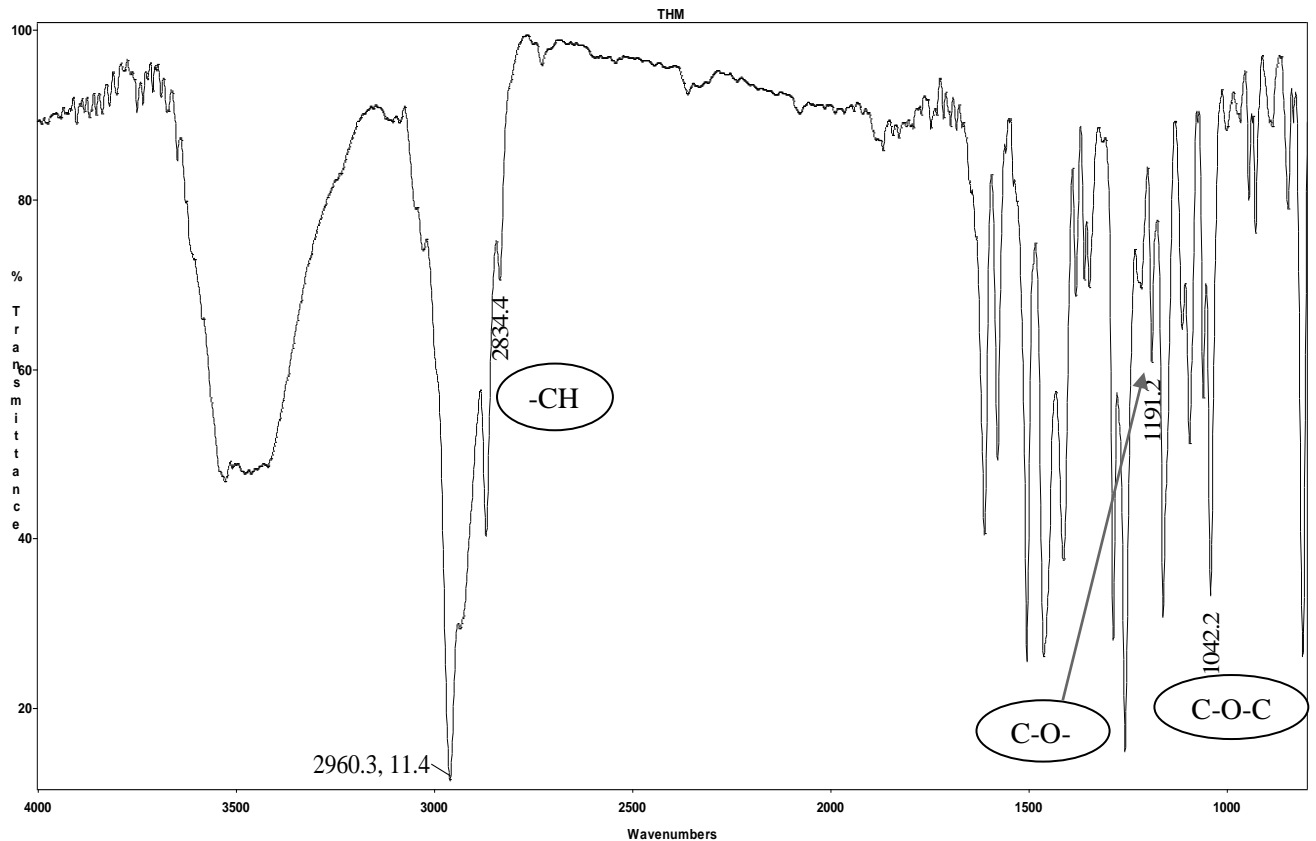


Figure19: spectre IR de l'huile de thymol méthyles

Discussion des résultats N°1:

- La molécule du thymol est caractérisée par la présence d'une fonction hydroxyle situé à 3229.7 cm⁻¹, des pics de vibration situés à 2959.2, 2927, 2867.9 cm⁻¹ relatifs à la liaison C-H méthyl, C-H aromatique, et C-H méthyne. Associés dans CH₃.
- En plus on a deux pics avec une absorbance à 1621.5 et 1585.4 cm⁻¹ correspondent à la liaison C=C-C aromatique.
- Deux pics avec une absorbance d'intensité variables de déformation de la liaison C=C-C à 1516.6 et 1459.4 cm⁻¹.
- Un pic de déformation situé à 1423 cm⁻¹ relatif à la liaison C-H méthyle (CH₃), trois pics de déformation de la liaison C-H méthyne avec une absorbance à 1380.2, 1361.3 et 1344.4 cm⁻¹. Et un pic de déformation situé à 1244.4 cm⁻¹ relatif à la liaison C-H aromatique.

- En plus on a une série des pics entre 1158.4 et 1004.6 cm⁻¹ correspondent à la présence d'une liaison (C-O) d'intensité forte de fonction éther (C-OH).
- L'alkylation de thymol par diméthyle sulfate a permis d'obtenir un produit huileuse dans l'analyse infrarouge (IR) a permis de la disparition de la bande de OH et l'apparition d'un nouveau pic relatif à la vibration CH de groupement (OCH₃) à 2834.4 cm⁻¹.
- La disparition de déformation de (OH) est remplacée par un pic de C-O- phényl, situé à 1191.2 cm⁻¹ relatif au groupe méthoxy (OCH₃).
- L'apparition de pic 1042.2 cm⁻¹ responsable à la vibration C-O de groupement (C-O-C).
- Ces résultats sont identiques à ceux déjà trouvés la littérature. [41]

➤ **Observation :**

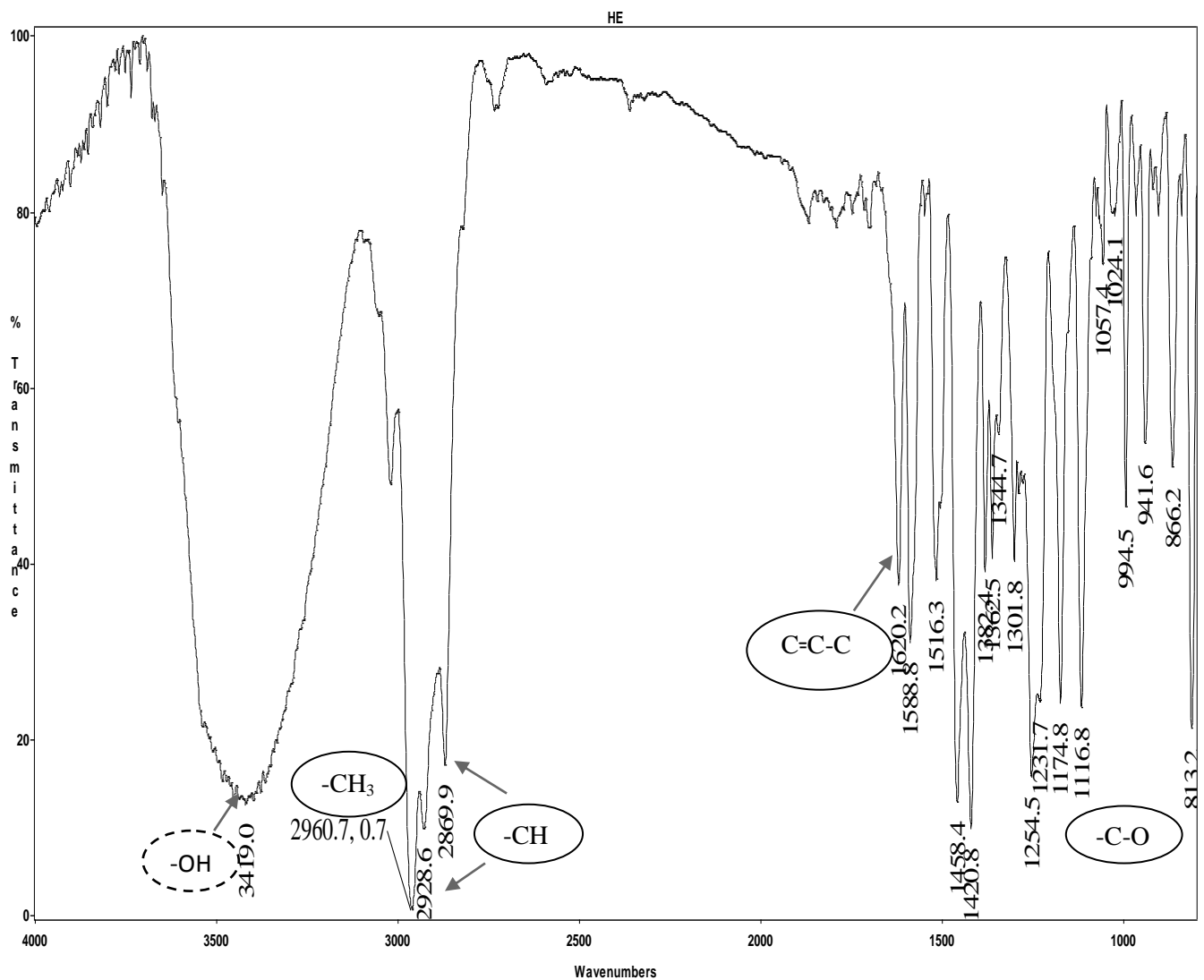


Figure 20 : spectre IR de l'huile essentielle de l'origan

Observation :

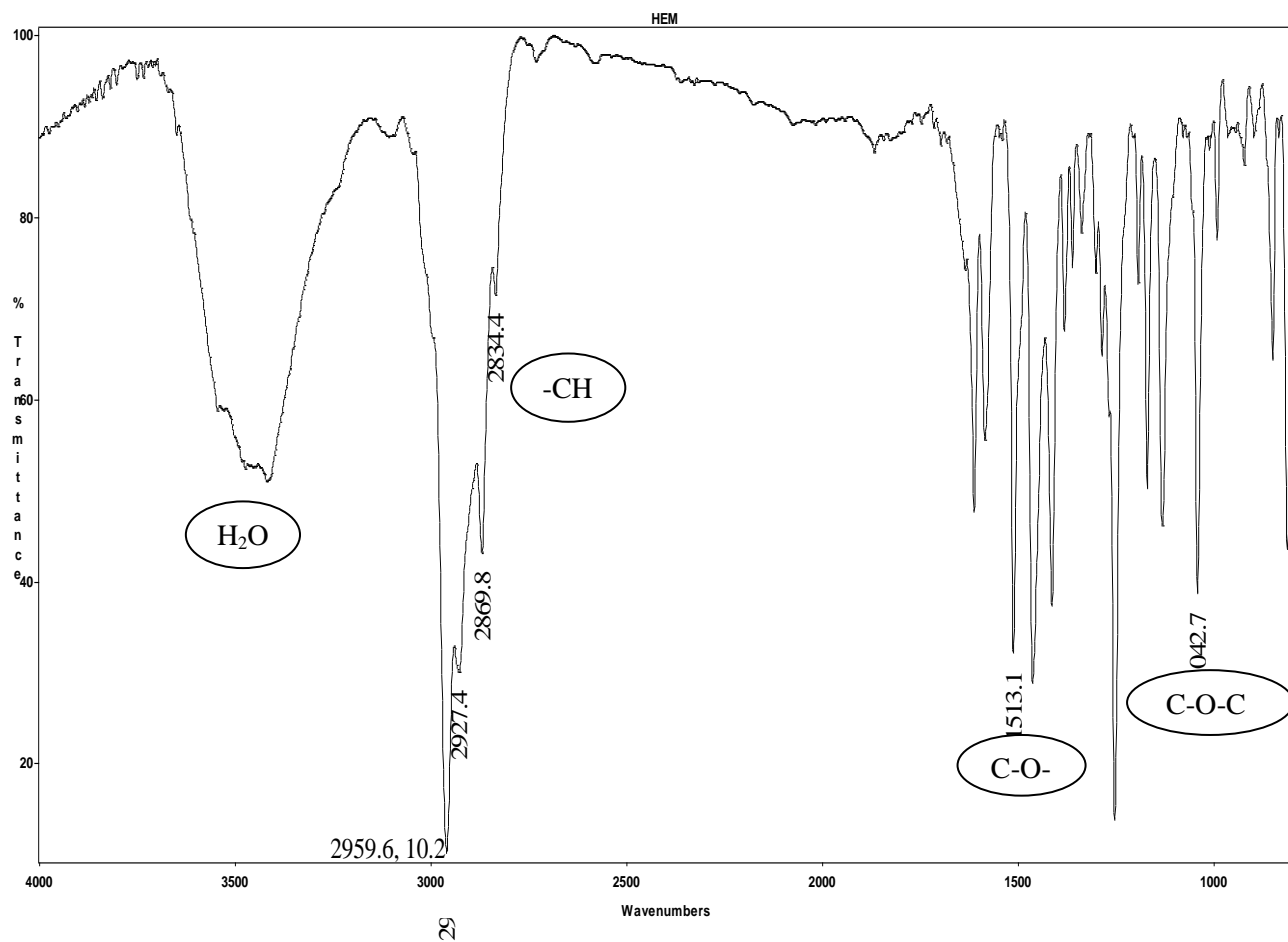


Figure 21 : spectre IR de l'huile essentielle méthyles.

Avec :

Abscisse : nombre d'onde cm-1

Ordonnée : Absorbance (%T) ou Transmittance $A = -\log(1/T)$

Discussion des résultats N°2:

- L'analyse de l'huile essentielle de l'origan est caractérisée par présence La large bande enregistrée à 3419cm^{-1} est une bande de vibration de la liaison OH justifiant la fonction phénol associé. Et trois pics, fins et étroits, de vibration d'élongation asymétrique de la liaison C-H associé dans CH₃, C-H aromatique, et C-H méthyne avec une absorbance forte à 2960.7 , 2928.6 , et 2869.9cm^{-1} .
- En plus on a un pic avec une absorbance à 1620.2 correspondent la liaison (C=C-C) aromatique.
- Deux pics avec une absorbance d'intensité variables de déformation la liaison (C=C-C) à 1516.3 et 1458.4cm^{-1} .
- Un pic de déformation située à 1420.8 cm^{-1} relatif à la liaison C-H méthyle (CH₃), trois pics de déformation la liaison C-H méthyne avec une absorbance à 1382.4 , 1362.5 et 1344.7cm^{-1} . Et deux pics étroits de déformation située à 1254.5 et 1231.7cm^{-1} . relatif à la liaison C-H aromatique.
- En plus on a trois pics entre à 1174.8 , 1116.8cm^{-1} , et 1057.4cm^{-1} correspondent à la présence d'une liaison (C-O-) d'intensité forte de fonction éther (C-OH).
- La méthylation de l'huile essentielle de l'origan par diméthyle sulfate a permet d'obtenir un produit huileuse dans l'analyse infrarouge (IR) a permis de la disparition de la bande de OH et l'apparition d'un nouveau pic relatif à la vibration CH de groupement (OCH₃) à 2834.6 cm^{-1} .
- La disparition de déformation de (OH) est remplacée par un pic de (C-O-) phényl, situé à 1513.1cm^{-1} relatif au groupe méthoxy (OCH₃).
- L'apparition de pic 1042.7cm^{-1} responsable à la vibration C-O de groupement (C-O-C).

4.3. Tests in vitro de l'activité antioxydant :

La capacité antioxydant de l'huile essentielle d'origan et de l'huile essentielle de l'origan méthyles des tests in vitro, l'évaluation de l'activité est donc nécessairement réalisée par au moins deux méthodes différentes. [42]

Remarque : Dans toutes les figures qui suivent la nomination elle est en suit: HE= l'huile essentielle de l'origan, HEM=l'huile essentielle de l'origan méthyles, TH= thymol et THM= l'huile de thymol méthyles, les numéros de 1 à 3 indiquent les défèrent dose (1 : [1g/ml] ; 2 : [0.5g/ml] ; 3 : [0.25g/ml])

4.3.1. Réduction du fer (FRAP) :

L'évaluation de l'activité antioxydant par réduction de fer est une méthode facile et reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les huiles les plus actifs. [43]

Pour tous les huiles, des dilutions en cascade allant de 1 à 0.25 g/ml, sont préparées, les pouvoirs réducteurs sont mesurés à 701 nm. [44]

Les valeurs de l'absorbance de différentes substances d'activité antioxydante par méthode de FRAP, consignés dans le tableau N°08.

Tableau N° 08: résultats d'absorbance de différentes substances par méthode de FRAP

Dose (g/mL)	0	0.25	0.5	1
AC	0	1.053	1.180	1.276
TH	0	1.253	1.322	1.377
THM	0	1.157	0.985	0.962
HE	0	1.635	1.744	2.075
HEM	0	1.166	1.110	1.094

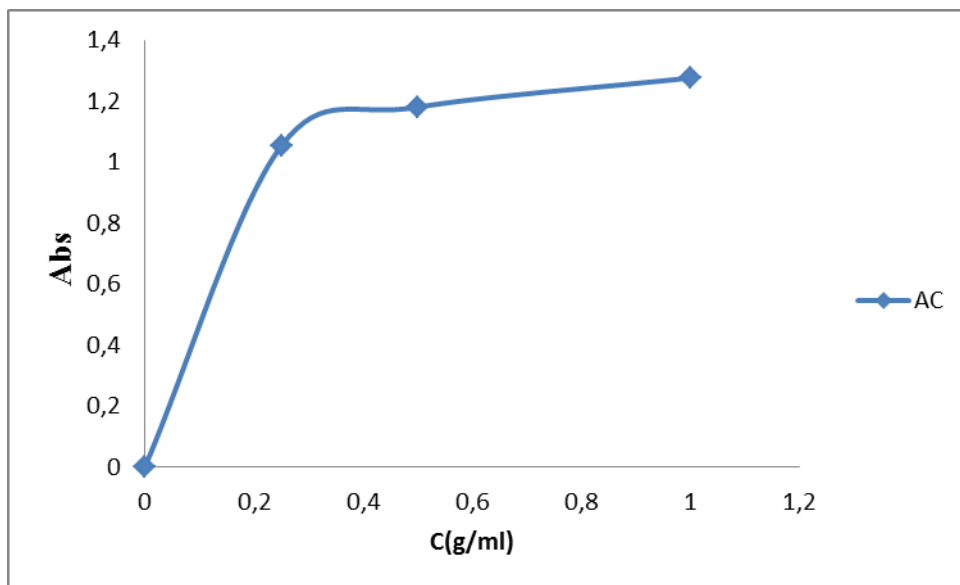


Figure 22 : pouvoir réducteur d'acide ascorbique

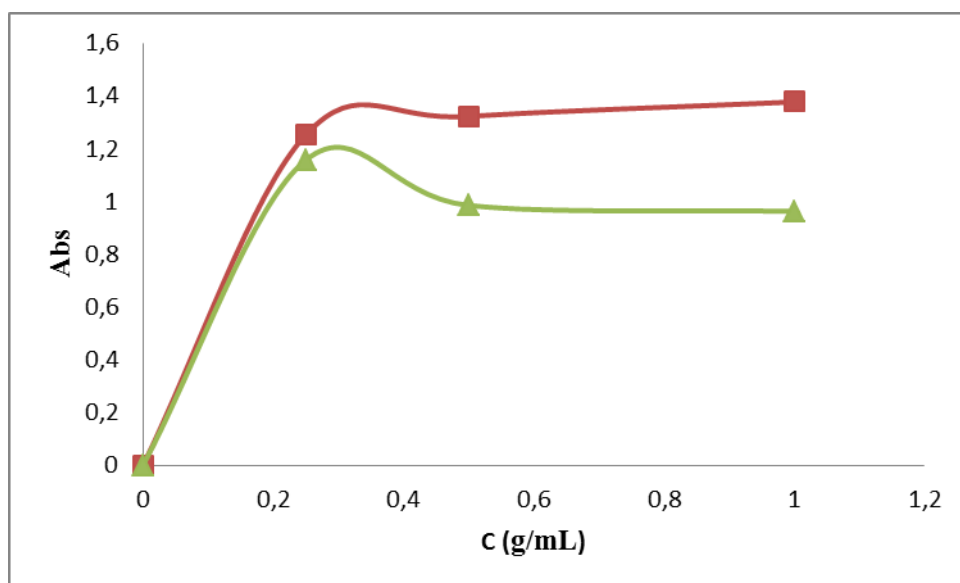


Figure 23 : Pouvoir réducteur de TH (■), THM (▲)

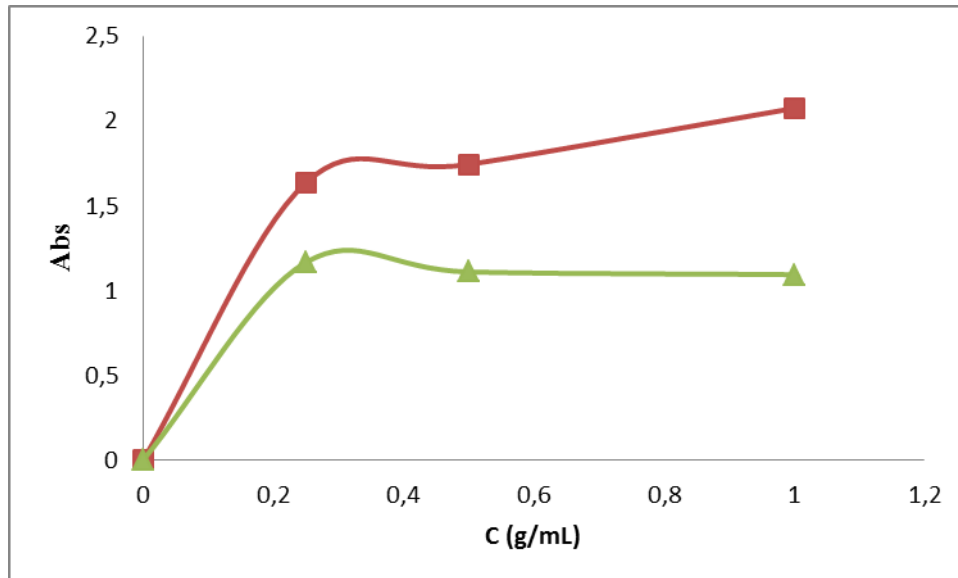


Figure 24 : pouvoir réducteur de l'HE (■), HEM (▲)

Les pouvoirs réducteurs de toutes les huiles, sont représentés dans l'histogramme ci-dessus pour avoir une idée sur les huiles les plus actifs.

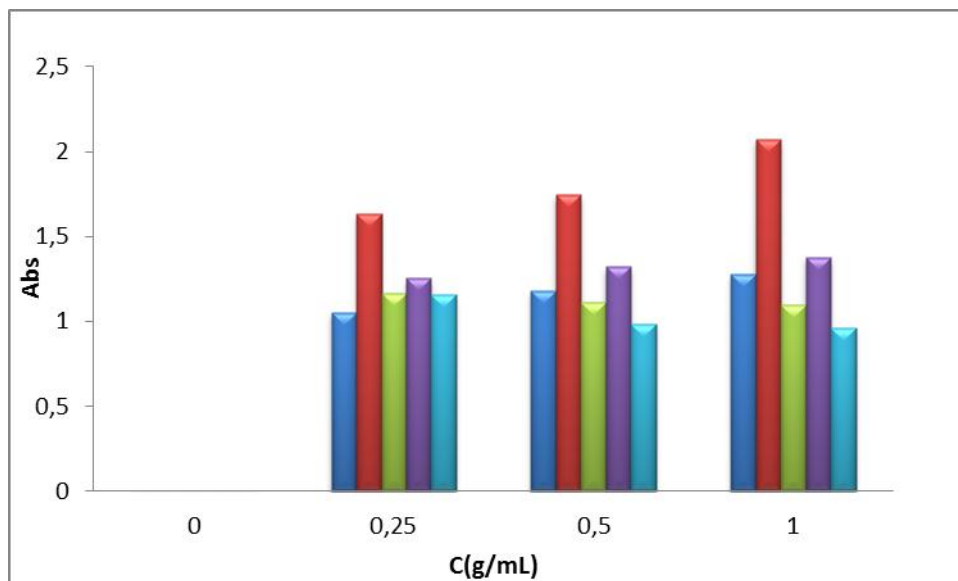


Figure 24 : l'histogramme de l'activité antioxydant de différente substance

L'analyse des résultats obtenus lors de la réduction du Fe(III) en Fe(II) par la méthode de FRAP montre que l'huile essentielle et le thymol pris comme référence possèdent des activités antioxydantes visualisés par une augmentation de l'absorbance en fonction de la concentration. Cependant la méthylation de l'huile essentielle et du thymol a réduit considérablement l'activité antioxydante indiqué par invariabilité de l'absorbance malgré l'augmentation de la concentration.

4.3.2. Piégeage du radical libre DPPH :

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour notre substances, nous avons employé la méthode au DPPH, ce radical libre synthétique présente une coloration violette sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite conférée à la solution une coloration jaune pâle (équation 14), le virage vers cette coloration et l'intensité de la couleur jaune reflète la capacité anti-radicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule.

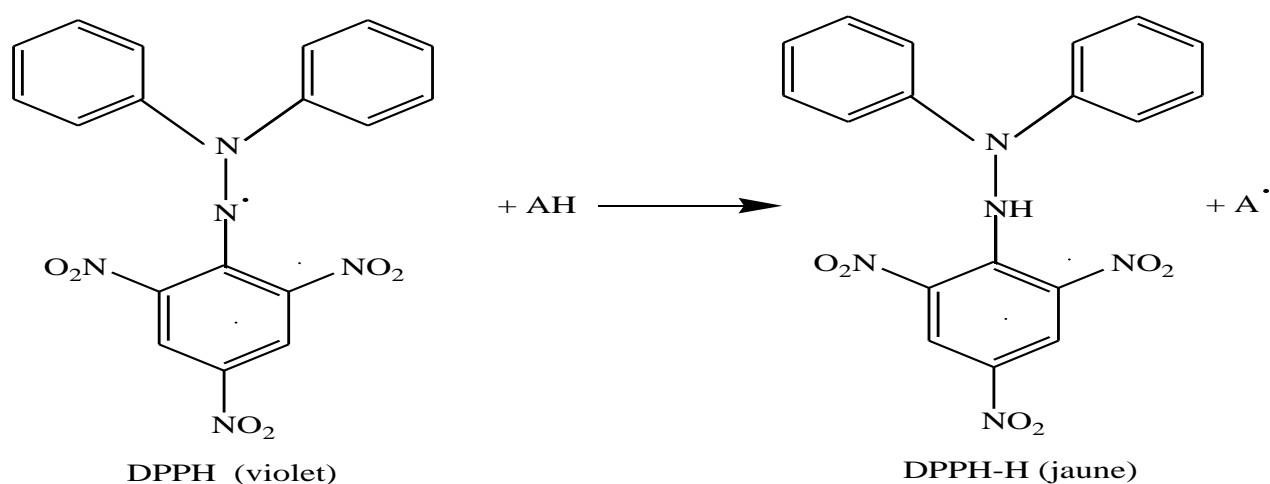


Schéma 15: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

4.3.2.1. Acide ascorbique :

Pour le DPPH l'absorbance mesurée à 516 nm pour chaque dose d'acide ascorbique, comme le montre le tableau N°09 et la figure 25.

Tableau N°09 : les résultats absorbance d'acide ascorbique et pourcentage d'activité anti-radicalaire

	[C](ng/ml)	0	25	50	75
Abs					
AC		0	0.256	0.119	0.016
%activité anti-radicalaire		0	39.19	71.73	96.19

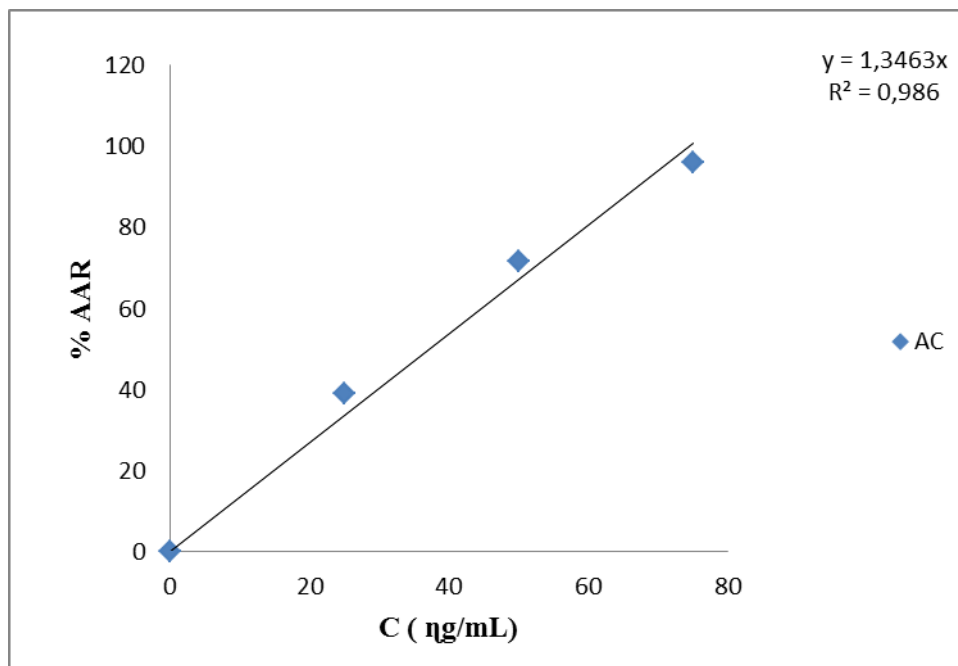


Figure 25: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'Acide Ascorbique

Pour montrer la capacité antioxydante de différentes substances, on a effectué plusieurs tests du taux de piégeage de radical libre DPPH sur l'huile essentielle de l'origan, l'huile essentielle de l'origan méthyles, thymol, et thymylate de méthyle. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau N° 10 et illustrés par les figures (26, 27).

Standard	Tube (N°)	Concentration (ng/mL)	V (µL)	Abs	I(%)
HE	01	0	0	0	0
	02	25	10	0.350	16,86
	03	50	20	0.139	66,98
	04	75	30	0.171	59,38
HEM	01	0	0	0	0
	02	25	10	0.391	7,12
	03	50	20	0.288	31.59
	04	75	30	0.260	38.24
TH	01	0	0	0	0
	02	25	10	0.400	4.99
	03	50	20	0.381	9.50
	04	75	30	0.381	9.50

THM	01	0	0	0	0
	02	25	10	0.403	4.27
	03	50	20	0.409	2.85
	04	75	30	0.410	2.61

Tableau N°10 : Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations des substances

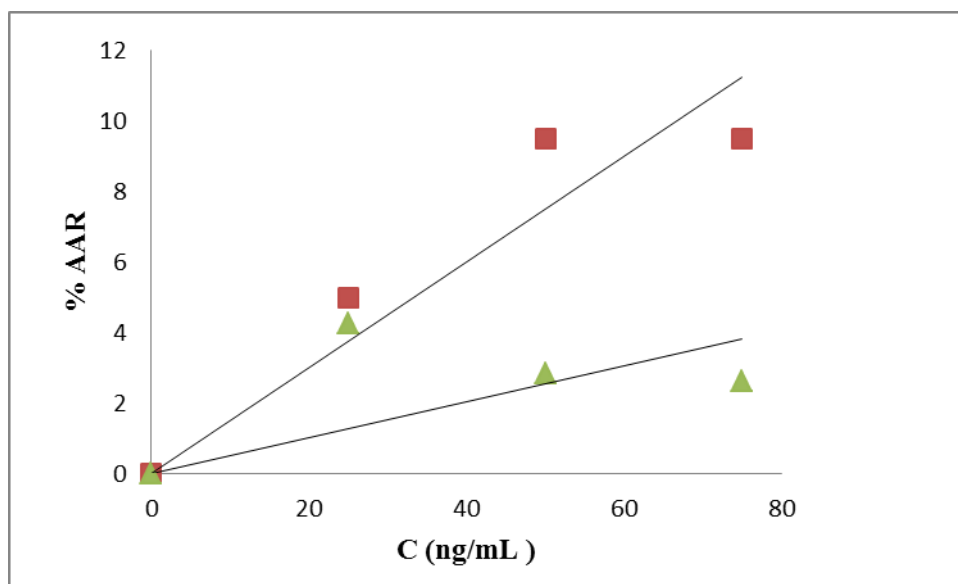


Figure 26 : L'activité anti-radicalaire de TH (■) et THM (▲) en fonction de concentration

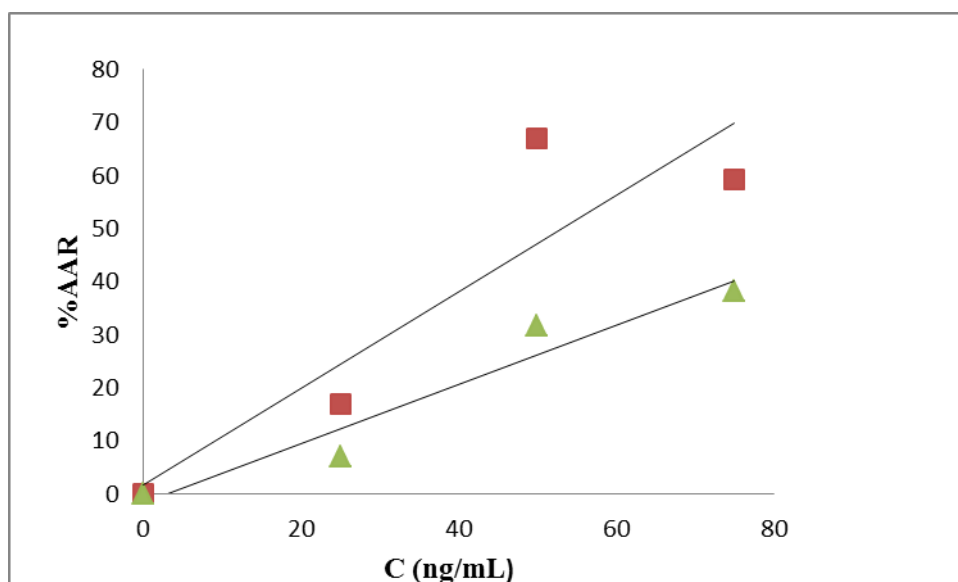


Figure 27: L'activité anti-radicalaire d'HE (■) et de l'HEM (▲) en fonction de concentration

4.3.3. Calcul des IC50 :

La capacité antioxydant de nos l'huile a été déterminée à partir des IC50. C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. L'IC50 et l'activité antioxydant de l'extrait testé sont inversement proportionnels. [45]

Nous avons calculé les IC50 pour chaque l'huile à partir de l'équation logarithmique de la courbe tracée, les valeurs sont représentées dans le tableau N°11.

Les substances	IC50 (ng/mL)
AC	37.14
TH	333.33
THM	982.32
HE	53.20
HEM	94.59

Tableau N°11 : Valeurs des IC50 en (ng/mL) de l'HE, L'HEM, TH, THM et de l'AC.

Comparaison entre les IC50 :

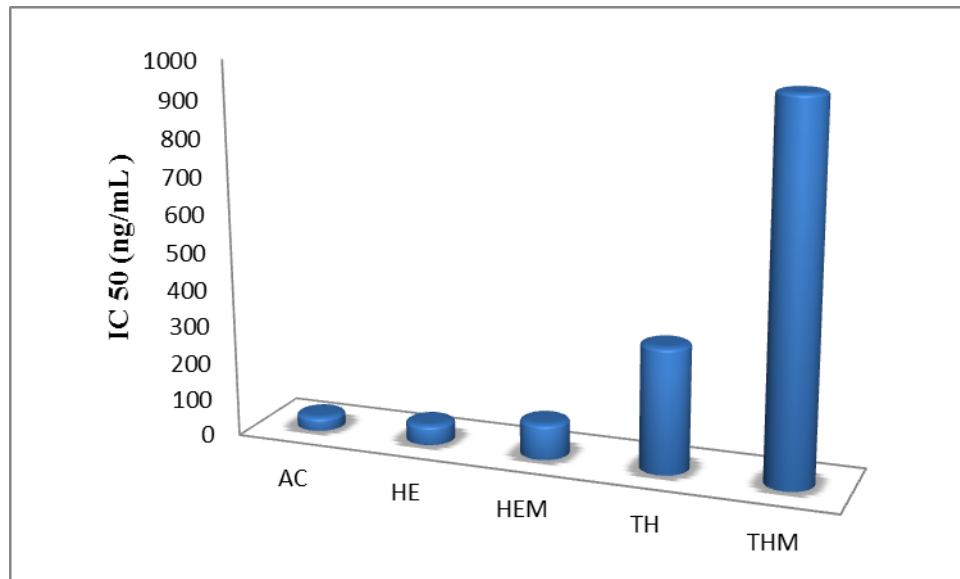


Figure 28 : Comparaison des valeurs IC50 de notre substance avec acide ascorbique

D'après les résultats obtenus on a le piégeage de radicales libres par la méthode de DPPH montre que l'huile essentielle de l'origan et le thymol a une activité anti-radicalaire importantes, qui a une relation proportionnelle aux concentrations utilisées.

Les résultats de méthode de DPPH pour l'huile essentielle méthyles et du thymol méthyles a réduit énormément l'activité anti-radicalaire indiqué par la constance de l'absorbance malgré l'augmentation de la concentration.

D'après les résultats, le classement des substances selon la méthode du piégeage du radical DPPH est confirmé par le classement obtenu par la méthode de réduction du fer.

Discussion des résultats :

- Les études faites sur l'activité antioxydante d'autres substances par la méthode de FRAP, ont montré une forte activité réductrice de l'HE et TH. Cette activité est due à la présence des composés phénoliques dans la plante ; vu l'existence d'une corrélation linéaire entre la proportion des composés phénoliques dans la plante et sa capacité antioxydante.
- L'activité antioxydante de l'huile essentielle de l'origan est due à sa richesse en carvacrol et en thymol. La concentration de ces derniers étant en relation directe avec le pouvoir antioxydant de la plante.
- L'efficacité de l'antioxydant (AH) augmente si la force de la liaison A-H est faible et le radical (A) résultant doit être le plus stable possible, les phénols sont des meilleurs donateurs d'électron ou d'hydrogène. Plusieurs études ont montrés que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants.
- La capacité antioxydante de l'huile essentielle de l'origan méthyles et thymol méthyles est largement dépendante de structure de ces molécules. Dans ce cas on a estimé par rapport les résultats qui ont a obtenus, que pas d'activité antioxydante et anti-radicalaire. Ce résultat est à cause de la modification chimique de l'huile essentielle de l'origan et thymol puisque la fonction hydroxy est change par une fonction méthoxy qui bloque la molécule.

4.4. Evaluation de l'activité insecticide des substances sur le charançon du blé (*Sitophilus Oryzae*) :

4.4.1. Test d'efficacité par contact :

4.4.1.1. Thymol :

Tableau N°12: Mortalité par contacte des insectes traités par solution de thymol.

Temps (h)	Mt (%)	Solution de thymol			
		0.125g/ml	0.25g/ml	0.5g/ml	1g/ml
24	15	Mc (%) 7.12	23.53	52.94	80.39

Les résultats consignés dans le tableau N°12 montrent que solution de thymol une faible activité insecticide sur la *Sitophilus Oryzae* pour faible dose.

Après 24h d'exposition elle a donné un taux de mortalité de 7.12% à la dose 0.125g/ml et il atteint doublé a 23.53 % à la dose 0.25g/ml. La valeur est augmentée à la dose 0.5 g/ml avec un taux de 92.15%.

Tableau N° 13: Mortalité corrigée par contacte des insectes traités par solution de thymol

	Solution de thymol			
Ln D (g/μL)	4.83	5.52	6.21	6.91
Probits x	3.53	4.28	5.08	5.85

4.4.1.2. Thymol méthyles

Tableau N°14: Mortalité par contacte des insectes traités par l'huile de thymol méthyles.

Temps (h)	Mt (%)	L'huile de thymol méthyles			
		0.125g/ml	0.25g/ml	0.5g/ml	1g/ml
24	15	Mc (%) 56.14	73.4	92.33	100

Les mortalités ont été observées en 1^{er} jour après traitement par un effet de choc .56.14% de mortalité est obtenu avec la dose 0.125g/l. Un taux de 73.4 % a été atteint avec la dose 0.25g/ml, et on a obtenu un taux de mortalité 100% avec la dose 1g/ml. Le taux de mortalité est 15% chez les témoins.

Tableau N° 14: Mortalité corrigée par contacte des insectes traités par l'huile thymol méthyles

	L'huile de thymol méthyles			
Ln D (g/μL)	4.83	5.52	6.21	6.91
Probits x	5.15	5.62	6.43	8.09

4.4.1.3. L'huile essentielle de l'origan :

Les résultats obtenus pour l'essai de contacte de l'huile essentielle de l'origan sont désignés dans le tableau N°15.

Tableau N°15: Mortalité par contacte des insectes traités par l'huile essentielle de l'Origan.

Temps (h)	Mt (%)	L'huile essentielle de l'origan			
		0.125g/ml	0.25g/ml	0.5g/ml	1g/ml
24	15	Mc (%) 58.1	78.96	92.15	100

Les résultats consignés dans le tableau N°15 montrent que l'huile essentielle de l'origan manifeste une activité insecticide vis-à-vis la *Sitophilus Oryzae* qu'à partir de la dose de 0.125 g/ml et après 24h d'exposition avec un taux de mortalité 58.1% ; la valeur est augmenté à la dose 0.5 g/ml avec un taux de 92.15%. L'effet de la dose sur la mortalité des insectes devient très important.

Tableau N° 16: Mortalité corrigée par contacte des insectes traités par l'huile essentielle d'origan

	L'huile essentielle de l'origan			
Ln D (g/μL)	4.83	5.52	6.21	6.91
Probits x	5.02	5.81	6.42	8.09

4.4.1.4. L'huile essentielle méthyles :

Tableau N°17: Mortalité par contacte des insectes traités par l'huile essentielle de l'Origan méthyles.

Temps (h)	Mt (%)	L'huile essentielle de l'origan méthyles			
		0.125g/ml	0.25 g/ml	0.5 g/ml	1 g/ml
24	15	Mc 24.06	58.46	84.66	96.07

Les résultats consignés dans le tableau N°17 montrent que l'huile essentielle de l'origan méthyles manifeste une activité insecticide sur la *Sitophilus Oryzae*.

Après 24h d'exposition elle a donné un taux de mortalité de 24.06% à la dose 0.125g/ml et il atteint 96.07% à la dose 1g/ml.

Tableau N° 18: Mortalité corrigée par contacte des insectes traités par l'huile essentielle d'origan méthyles

	L'huile essentielle de l'origan méthyles			
Ln D (g/μL)	4.83	5.52	6.21	6.91
Probits x	4.29	5.21	6.02	6.63

Remarque :

Les insectes se trouvant dans la boîte pétri témoin on a enregistré trois cas de mort. Nous avons gardé cette boîte de pétri avec les insectes plus de 3 jours dans notre laboratoire et aucun mort n'a été enregistré après 24 heures.

Tableau N° 20: Efficacité des substances étudiées par contact après 24 heures d'exposition.

Les substances	TH	THM	HE	HEM
DL 50(g/mL)				
Application par contacte	0.45	0.14	0.14	0.22

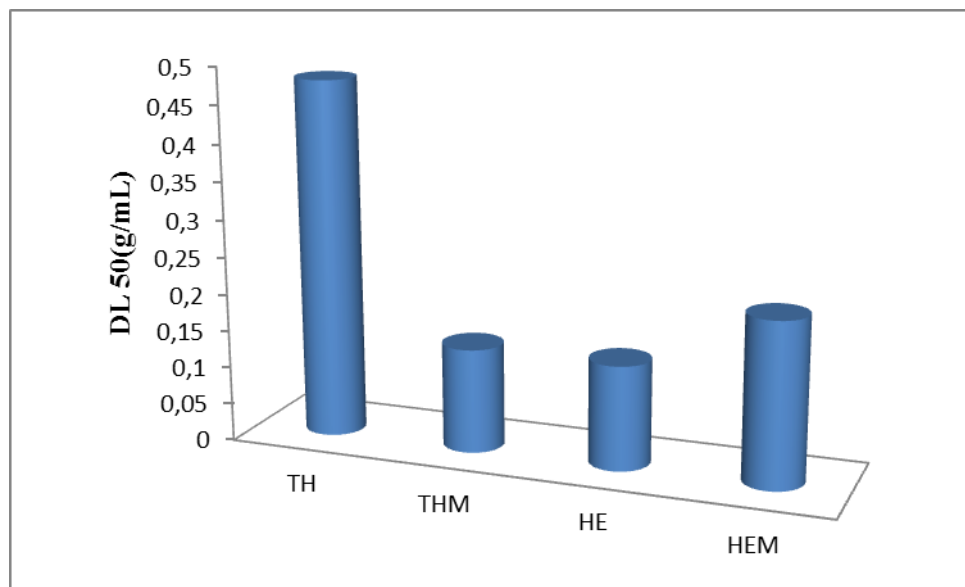


Figure N°33: Comparaison des valeurs DL50 de l'efficacité des substances par effet contact

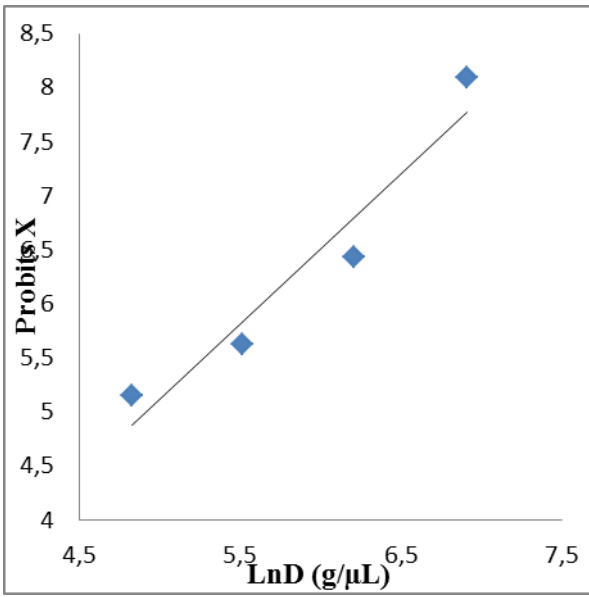


Figure 29: Efficacité par effet contact de TH après 24h

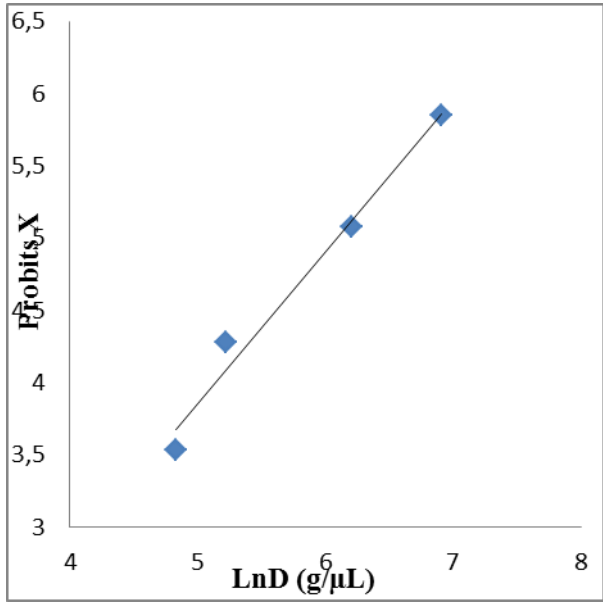


Figure 30: Efficacité par effet contact de THM après 24h

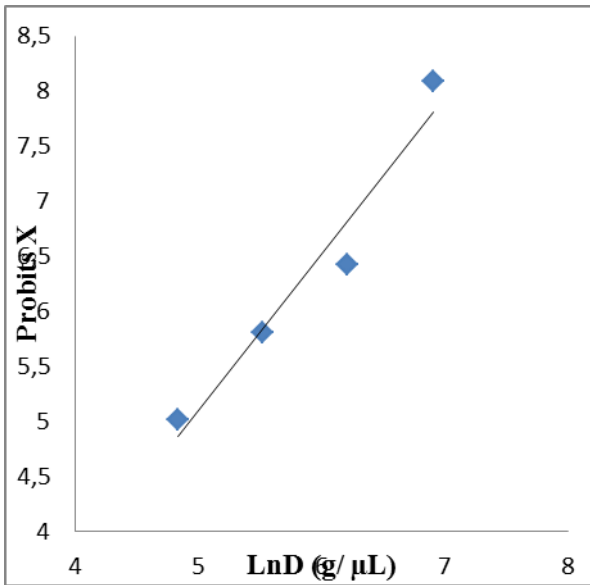


Figure 31: Efficacité par effet contacte de l'HE après 24 h

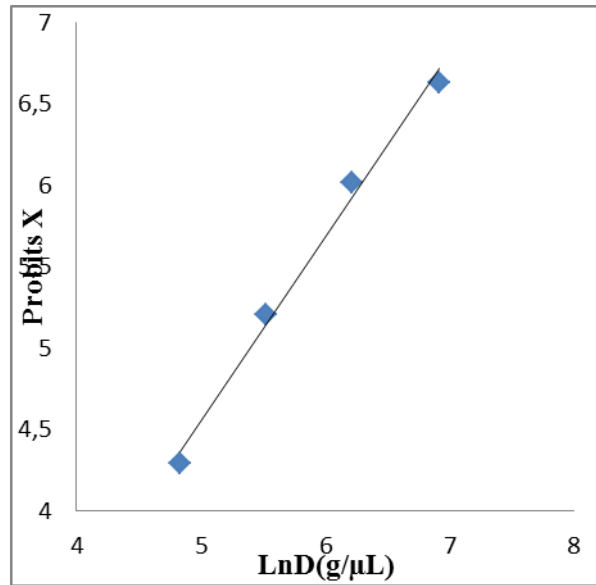


Figure 32: Efficacité par effet contacte de l'HEM après 24h

4.4.2. Test d'efficacité par inhalation :

4.4.2.1. Thymol:

Tableau N°21: Mortalité par fumigation des insectes traités par solution de thymol

Temps (h)	Mt (%)	Solution de thymol			
		0.125g/ml	0.25g/ml	0.5g/ml	1g/ml
24	15	Mc (%)	47.05	72.55	70.58
		11.76			

Concernant les résultats enregistrés par cette méthode nous avons constaté que les mortalités ont été observées en 1^{er} jour après traitement. Au dose 0.125g/ml un taux de 11.76%, 47.05% avec la dose 0.25g/ml, le taux de mortalité il est augmenté jusqu'à 72.55% avec la dose 0.5g/ml. On n'a pas un grand changement pour la dose 1 g/ml Le taux de mortalités est 70.58%.

Tableau N° 22: Mortalité corrigée par fumigation des insectes traités par solution de thymol

	Solution de thymol			
Ln D (g/μL)	4.83	5.52	6.21	6.91
Probits x	3.81	4.92	5.60	5.54

4.4.2.2. Thymol méthyles

Tableau N°23: Mortalité par fumigation des insectes traités par l'huile de thymol méthyles

Temps (h)	Mt (%)	L'huile de thymol méthyles			
		0.125g/ml	0.25g/ml	0.5g/ml	1g/ml
24	15	Mc (%)	49.02	74.51	98.04
		17.65			

Concernant les résultats enregistrés par cette méthode nous avons constaté que les mortalités ont été observées en 1^{er} jour après traitement. Au dose 0.125g/ml un taux de 17.65%, 49.02% avec la dose 0.25g/ml, le taux de mortalité il est augmenté jusqu'à 74.51% avec la dose 0.5g/ml.

Tableau N° 24: Mortalité corrigée par fumigation des insectes traités par l'huile thymol méthyles

	L'huile de thymol méthyles			
Ln D (g/μL)	4.83	5.52	6.21	6.91
Probits x	4.07	4.97	5.65	7.06

4.4.2.3. L'huile essentielle de l'origan :

Tableau N°25: Mortalité par fumigation des insectes traités par l'huile essentielle de l'Origan.

Temps (h)	Mt (%)	L'huile essentielle de l'origan			
		0.125g/ml	0.25g/ml	0.5g/ml	1g/ml
24	15	Mc (%) 23.53	37.25	82.35	88.23

L'huile essentielle de l'origan devient mortelle sur les Sitophilus Oryzae à la troisième dose et quatrième dose, allant de 82.35 à 88.23%, pour autres doses, la mortalité était faible 23.53% pour la première dose et 37.25% pour la deuxième dose.

Tableau N° 26: Mortalité corrigée par fumigation des insectes traités par l'huile essentielle d'origan

	L'huile essentielle de l'origan			
Ln D (g/μL)	4.83	5.52	6.21	6.91
Probits x	4.28	4.67	5.93	6.19

4.4.2.4. L'huile essentielle de l'origan méthyles :

Tableau N°27: Mortalité par fumigation des insectes traités par l'huile essentielle de l'Origan méthyles.

Temps (h)	Mt (%)	L'huile essentielle de l'origan méthyles			
		0.125g/ml	0.25 g/ml	0.5 g/ml	1 g/ml
24	15	Mc 15.64	39.29	84.31	98.04

Concernant les résultats enregistrés par cette méthode nous avons constaté que les mortalités ont été observées en 1^{er} jour après traitement. Au dose 0.125g/ml un taux de 15.64%, 39.29% avec la dose 0.25g/ml, le taux de mortalité il est augmenté jusqu'à 84.31% avec la dose 0.5g/ml.

Tableau N° 28: Mortalité corrigée par fumigation des insectes traités par l'huile essentielle d'origan méthyles

	L'huile essentielle de l'origan méthyles			
Ln D (g/μL)	4.83	5.52	6.21	6.91
Probits x	3.99	4.73	6.01	7.06

Tableau N° 29: Efficacité des substances étudiée par fumigation après 24 heures d'exposition.

Les substances DL 50 (g/mL)	TH	THM	HE	HEM
Application par fumigation	0.38	0.26	0.28	0.27

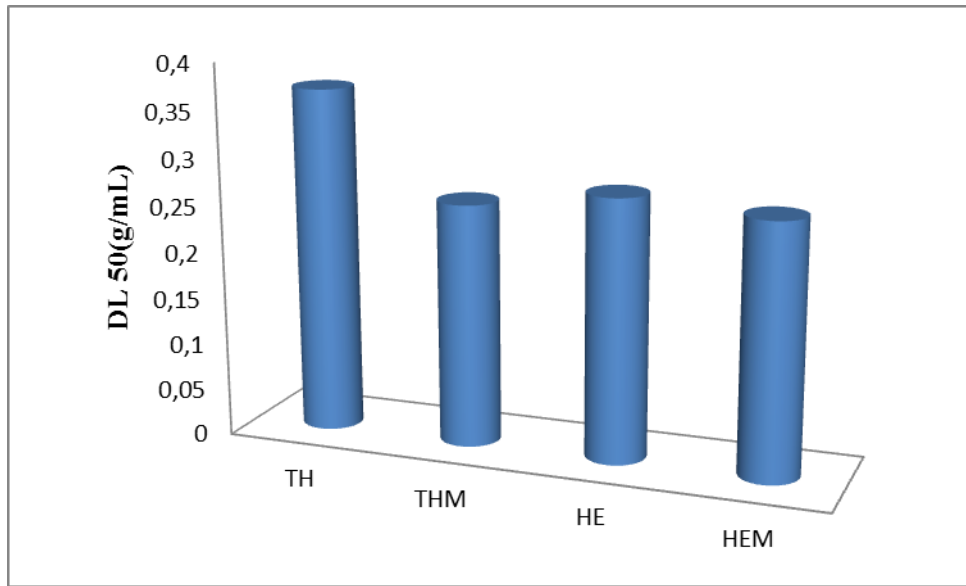


Figure 38: Comparaison des valeurs DL50 de l'efficacité des substances par effet fumigation

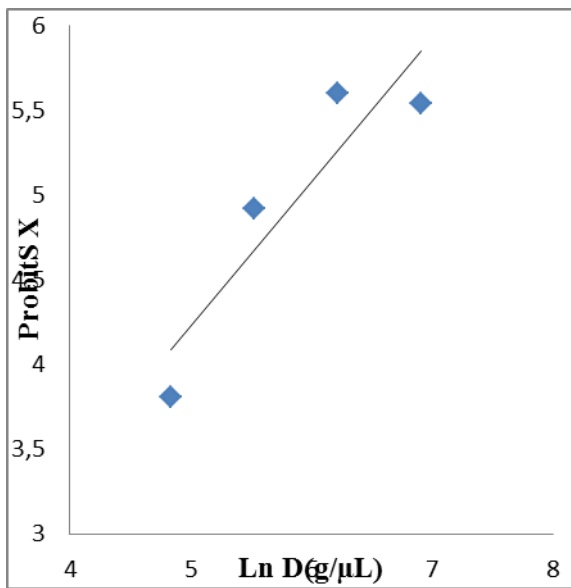


Figure 34: Efficacité par effet fumigation de TH après 24h

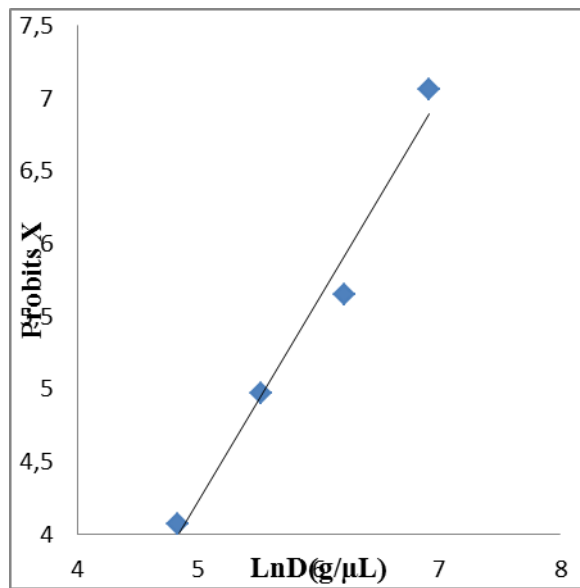


Figure 35: Efficacité par effet fumigation de THM après 24h

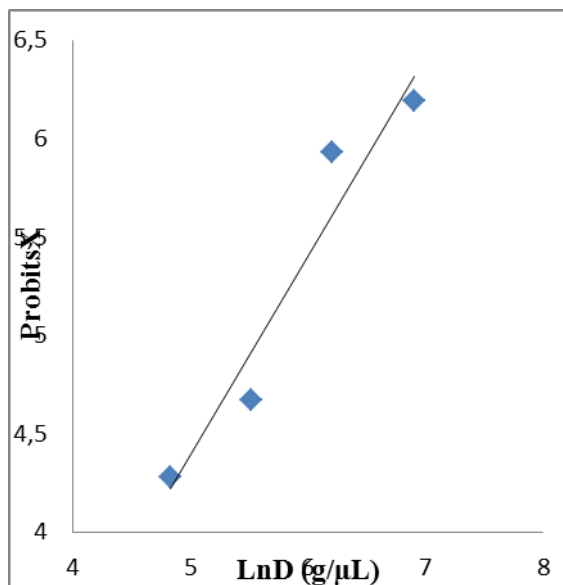


Figure 36: Efficacité par effet fumigation de l'HE après 24h

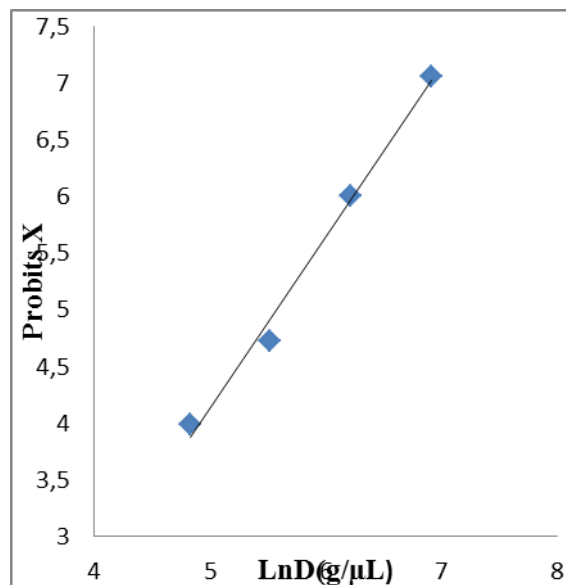


Figure 37: Efficacité par effet fumigation de l'HEM après 24h

Discussion des résultats :

- L'analyse des résultats obtenus avec les DL50 dans le cas de l'étude de l'activité insecticide par contact, montre que l'huile essentielle de l'origan est très efficace à vis-à-vis de la même huile obtenu par méthylation.
- La valeur de DL50 de l'origan est exactement équivalente à celle au thymol méthyles cependant l'huile essentielle méthyles est moins efficace que l'huile essentielle source mais elle est plus efficace que le thymol seul.
- Cette différence peut être dû à la composition chimique de l'huile essentielle méthyles et le synergie entre les molécules.
 - La méthylation de l'huile essentielle n'a presque pas influence sur l'activité insecticide en application par fumigation par contre ce changement est très important pour le thymol.
 - Celui peut être appliqué par la nature du thymol méthyles, de l'huile essentielle de l'origan, et l'huile essentielle de l'origan méthyles.



Conclusion

Conclusion :

L'épuisement de l'origan en l'huile essentielle par l'entraînement à la vapeur d'eau a été réalisé en 90 min avec un rendement de 2.2%.

L'analyse GC et GC/MS a permis d'effectuer la chimiotaxonomie de l'origan. Le carvacrol est le composé majoritaire de l'huile essentielle de l'origan avec une petite proportion en thymol.

La spectroscopie IR a permis de confirmer la réussite de la méthylation de carvacrol et du thymol. Le carvacrylate de méthyle et le thymylate de méthyle ont été identifiés par CPG.

La réduction de Fe(III) en Fe(II) a permis de mettre en évidence l'activité antioxydante de l'huile essentielle de l'origan et la modification réalisée au sein de cette huile essentielle.

Aussi l'effet hypsochrone du radical DPPH sous l'action de l'huile essentielle de l'origan étant une preuve pure l'efficacité de l'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle de l'origan.

Cette activité a été totalement éliminée par la substitution du proton de groupement hydroxyle par le groupement méthoxy.

L'huile essentielle de l'origan possède une activité insecticide importante pour les deux techniques d'application : par contact et par fumigation.

Les résultats obtenus dans le cas d'application de l'huile essentielle de l'origan par contact sont plus avantageuses que ceux obtenus par fumigation.

La méthylation de l'huile essentielle de l'origan a été avantageuse surtout dans le cas de l'application par fumigation.

L'étude de cette modification doit être poursuivie à fin d'établir une corrélation entre la structure et l'activité et les méthodes modernes d'oxydation.

Reference bibliographies

- [1] Ayvar A, Sagdic O, karaborklu S, Ozturk I. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. *Journal of Insect Science* 21 (2010) 10, 1-13.13pp.
- [2] Ouabel F, Meriane H. Recherche de principes actifs à effet répulsif ou insecticide dans la rue (*RUTA MONTANA*). 2006.
- [3] Boutoumi H, Moulay S, Khodja M; essential oil from *Ruta Montana* L.(Rutaceae); chemical composition, insecticidal and larvicidal activities, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, jeobp 12(6), 2009, pp 714-721.
- [4] Guenther E, in «The Essential Oils». Vol.I. Krieger Publishing Co., Malabar, Florida 1972.
- [5] P. Franchomme, R. Jollois et D. Péroël, in «L'aromathérapie exactement », Roger Jollois, éditeur, Limoges, France 1990, pp 44-48
- [6] Adio A. M. isolation and structure elucidation of sesquiterpenoids from the essential oils of some liverworts (*Hepaticae*). 2005, pp280
- [7] Sousa EMBD, Chiavone-Filho O, Moreno M.T, Silva D.N, Marques M.O.M, et Meireles M.A.A. experimental results for the extraction of essential oil. 2002, pp 229-241.
- [8] Claude verdan. Le monde magique du parfum une exposition proposée par le comité français du parfum.
- [9] Schwamml B, Winkelhausen E, Kuzmanova S, et Steiner W. Isolation of carvacrol assimilating microorganisms, *Biotechnol.* 2001, pp341-345.
- [10] Binet P, et Bruel J.P. *Physiologie Végétale*. Tome II. Edit.
- [11] Ntezurubanza L, in « Les huiles essentielles du Rwanda ». LASEVE-UQAC, Chicoutimi, Québec 2000.
- [12] Garneau F X, Notes du cours *Produits naturels*. Département des sciences

fondamentales, UQAC, Chicoutimi, Québec 2001.

[13] Smith C.K, Moore C.A, Alahi E.N, Smart A.T, Hotchkiss S.A. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000, pp 168-189-99.

[14] Homburger F, Boger E. The carcinogenicity of essential oils, flavors and spices: A review. *Cancer Res.* 1968, pp 28- 2372-2374.

[15] Pauli A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather.* 2001, pp 11- 126- 133.

[16] Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 2003, pp 10- 813-829

[17] Maach A, et Jemalia. Etude des caractéristiques physico-chimiques des HE de deux plantes aromatiques cultivées au Maroc: Menthe Naa Naa Abdi, Coriandre. IAV Hassan II, Rabat, Maroc. 1986.

[18] Blayn J-F. *Parfums Cosmétique Arômes.* 1980, pp 117.

[19] Edris A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* 2007, pp 21- 308-323.

[20] Braga P.C, Dal Sasso M, Culici M, GaSastri L, Marceca MX, Guffanti E.E. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology.* 2006, pp 76-61-68.

[21] Regnault-Roger C, Philogène B.J.R. Evolution des insecticides organiques de synthèse. Dans : enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement ; (eds. Regnault-Roger, C., Fabres, G., Philogène, B.J.R.). Edition TEC et DOC. Paris. 2005, pp 20-43.

[22] Ducomp. Traitement par fumigation. In: les insectes et les acariens des cereals stockées. Normes et thechnique des céréales et des fourrages. AFNOR-ITCF. 1978, pp 138- 164.

[23] El lakwahf F. Fumigation experiments with phosphine in traditional mud silos in Egypt to control stored- product insects. Proceeding 5th international working confetrence on stored-product protection. Bordeaux. Vol. II, Eds: F. Fleurat-Lessard et P. Ducom. Sept (9-14-1990)

, pp 799-810.

[24] Winks R.G. Recent developement in the fumigation of grain with phosphine. Proceedings 5th international working conference on stored-product protection, Bordeaux. Vol. II. Eds: F. Fleurat-Lessard et P. Ducom. Sept. 9-14-1990, 935-943p.

[25] Addor R.W. Insecticides In: Godfry, C.R.A. Ed Agrochemicals from Natural Products. Marcel Dekker inc. New York. 1995, 1-63p.

[26] Mann J. Secondary Metabolism. Clarendon press, Oxford, UK, 1987.

[27] Penoel D. La médecine aromatique. Research. Mediterranea. 1994.1,pp 24-29.

[28] Beyer W, lehrbuch der organischen chemie, S hirzel verlag stuttgart RFA. 22 edition, 1991.

[29] Bernini R, Crisante F, Ginnasi M C; A convenient and safe o-methylation of flavonoids with dimethyl carbonate (DMC), 2011, p 1418-1420.

[30] Collectif d'auteurs, organikum, dresden, BRD(RFA), 1974, p 251.

[31] Ratnadass A. Dynamique des populations d'insectes ravageurs des stocks de céréales en milieu villageois d'Afrique tropicale. Thèse Mag. Agr. I.N.A. Paris. Grigno. 1987, p 236.

[32] FLEURAT-LESSARD F. Sensibilité des produits des industries agro-alimentaires aux insectes et aux acariens. Bulletin du comité pour les applications des insecticides et la protection des denrées alimentaires (C.I.L.D.A.). 1991, p 39-56.

[33] Belhad ELHADJ N, Ferdi D. Contribution à la détermination des critères qualitatifs de quelques variétés de blé tendre (*Triticum aestivum*) et de leur sensibilité à l'attaque du prédateur primaire *Sitophilus oryzae* L. Mémoire. Ing. Biologie.C.C.A.I.N.E.S. Blida. 2004, p 87.

[34] Yamini Y, Khajeh M, Mirza M, ET Javidnia K. comparisons of essential oil composition of *salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methodes. Food chemistry, 2008,p 34-364.

[35] Quezel P, et santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.Tome II.Ed.C.N.R.S.Paris. 1963.

- [36] AFNOR, Huiles essentielles, échantillonnage et méthode d'analyse. Ed. PARA Graphic, T-1. 2000, P 471.
- [37] YILDIRIM A, MAVI A et KARA A A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts; Journal of Agricultural and Food Chemistry 49. 2001, p 411-420.
- [38] SANCHEZ-MORENO C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems; International Journal of Food Science and Technology 8. 2002, 121-137
- [39] MANSOURI A, EMBAREK G, KOKKALOU E et KEFALAS P.; Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*); Food Chemistry 89. 2005, p 411-420.
- [40] TORRES R et al. Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappus multifolius*; Phytochemistry 67; Ed: ELSEVIER. 2006, p 984-987.
- [41] John Coates; interpretation of infrared spectra, a practical approach. Meyers (Ed), 2000, p 10815-18037
- [42] WONG S. P., LEONG L. P, et KOH J.H.W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants; Food Chemistry 99. 2006, p 775–783.
- [43] LI H.B., CHENG K.W., WONG C.C., FAN K.W. CHEN, F. et JIANG Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae; Food chemistry 102. 2007, p 771-776.
- [44] AMAROWICZ R., ESTRELLA I., HERNANDEZ T., ROBREDO S., TROSYNSKA A, KOSINSKA A. et PEGG R. Free radicals-scavenging capacity: antioxidant activity and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*); Food Chemistry 121; Ed: ELSEVIER. 2010, p 705-711.
- [45] PRAKASH D., UPADHYAY G., BRAHMA N. et SINGH H.B. Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean; Food Chemistry 104. 2007, p 783-790.

Annexe 01

L'ensemble de matériel non biologique est comme suivant :

✚ Entrainement à la vapeur d'eau :

Matériel :

- Ballon de 1L
- Ampoule à décanter
- Système de refroidissement
- Chaudière
- Burette

Réactive :

- Sulfate de sodium anhydre

✚ La méthylation de l'huile essentielle de l'origan et de thymol synthétique :

Matériel :

- Ballon 250ml
- Réfrigérant
- Agitateur
- Bain marie
- Burette
- Barreau magnétique
- Balance

Réactifs :

- Diméthyle sulfate (DMS)
- KOH à 10%

✚ Les analyses physico-chimiques :

Indice de réfraction :

Matériel :

- Réfractomètre.

Indice acide :

Matériel :

- Balance
- Burette
- Fiole de 100ml
- Bécher de 100ml

Réactifs :

- Phénophtaléine
- Ethanol 96%
- KOH (0.1mol/l)

Indice d'ester :

Matériel :

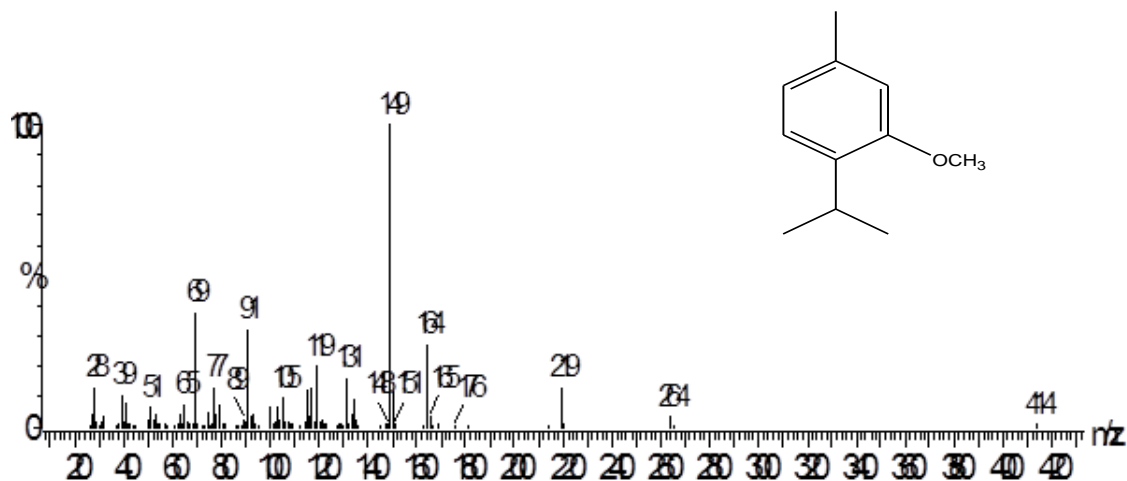
- Balance
- Place chauffent
- Barreau magnétique
- Réfrigérante
- Ballon de 250ml
- Bain marie

Réactifs :

- KOH (0.5mol/l)
- Acide chlorhydrique (0.5mol/l) (HCl)
- Ethanol 96%

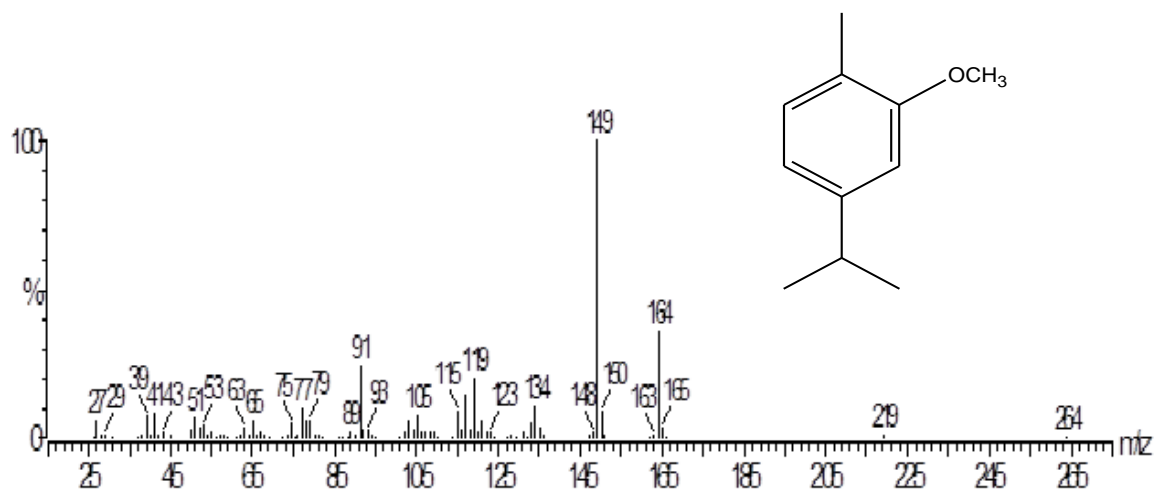
Annexe N°02

Spectre de masse: Temps: 14.41 mn (Thymylate de méthyle)



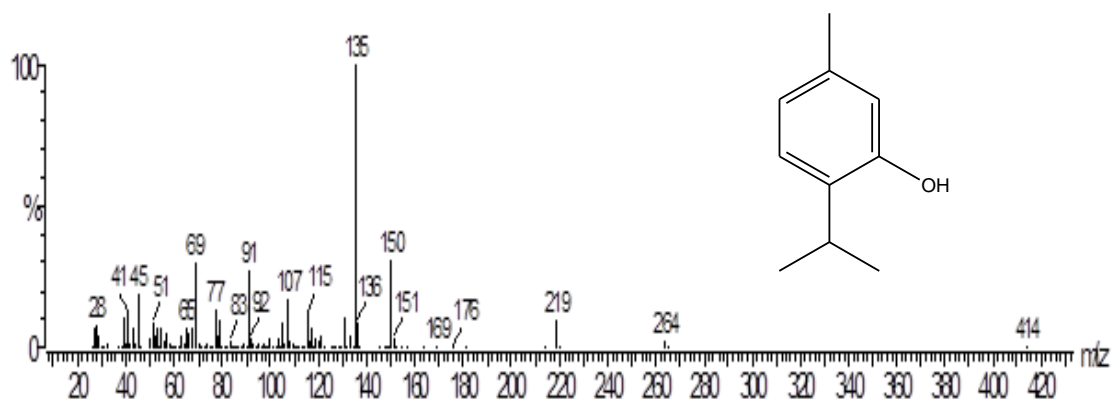
- Spectre de fragmentation de thymylate de méthyle

Spectre de masse: Temps: 14.85 mn (carvacrylate de méthyle)



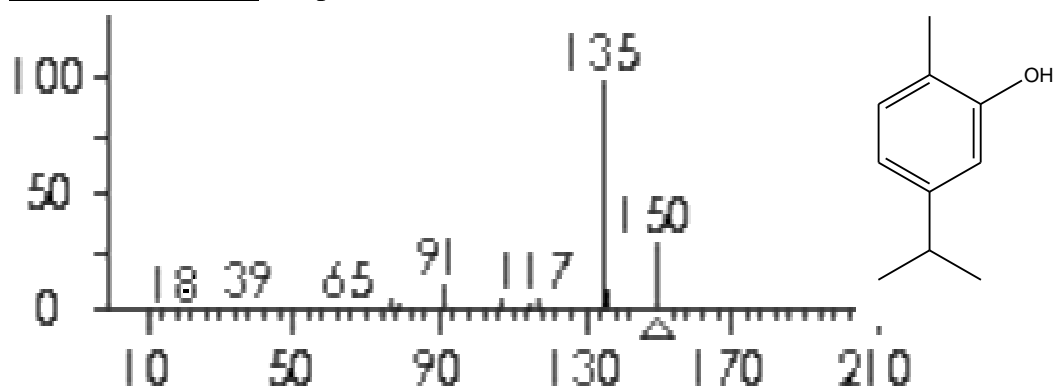
- Spectre de fragmentation de carvacrylate de méthyle

Spectre de masse: Temps: 16.67 mn (Thymol)



- Spectre de fragmentation de thymol

Spectre de masse: Temps: 16.97 mn (carvacrol)

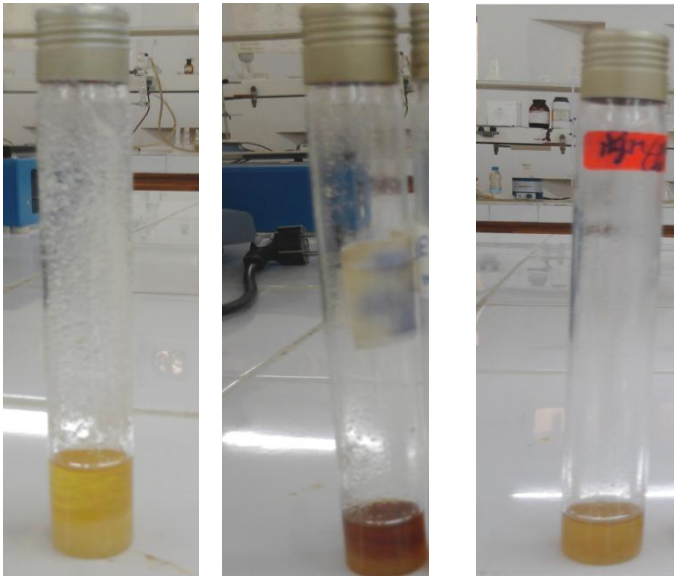


- Spectre de fragmentation de carvacrol

Annexe N°03



- Montage de la méthylation de l'huile essentielle de l'origan



- Figure de L'huile essentielle de l'origan, l'huile essentielle de l'origan méthyles et huile de thymol méthyles



- Chromatographe en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse