

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA I



FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET BIOLOGIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE

*Mémoire de fin d'études*

En vue de l'obtention du diplôme de Master en science de la nature et  
de la vie

Option : Biotechnologie des plantes aromatiques et médicinales et des  
produits naturels

Thème :

Contribution à l'étude de  
l'activité biocide des extraits du  
géranium rosat (*Pelargonium  
graveolens*) et de l'origan  
(*Origanum glandulosum*)

Présenté par:  
Makhlaf Nacereddine

Devant le jury:

|                     |     |      |              |
|---------------------|-----|------|--------------|
| Mme Allal L. :      | Pr  | USDB | Président    |
| Mme Hamiche A. :    | MCB | USDB | Examinatrice |
| Mme Moumène S. :    | MAA | USDB | Examinatrice |
| Mme Belguendouz R.: | MCB | USDB | Promotrice   |

PROMOTION 2014-2015

# Remerciements

*Au terme de ce travail, je tiens vivement à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce présent mémoire.*

*Tous d'abord je tiens à remercier Mme Belquendouz R, qui a été le promoteur de cette étude. Elle a aidé en m'accordant une grande confiance dans la démarche de mon travail, sans oublier son regard pertinent et ses critiques constructives.*

*Ce travail n'existerait pas sans son aide et sa bienveillance.*

*Mes gratitudee vont également aux membres de jury :*

*Madame Allal L. qui nous a honoré de présider le jury.*

*Madame Moumene S. d'avoir accepté et apprécié d'examiner ce travail.*

*Madame Hamiche A. d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je tiens à remercier aussi Mme ghenai R, et Mme Chebata N. d'avoir toujours été omniprésentes pour me répondre et me faire part de leur savoir faire.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à l'ensemble des enseignants de BPAM-PN de Blida.*

*Je ne pourrais oublier mes parents, la famille ainsi que les amis DE PARS leurs encouragements et l'intérêt qu'ils ont montrés pour mener à bien ce mémoire.*

# Dédicaces

*Je dédie ce mémoire à :*

*-Ma mère, avec toute ma gratitude pour le dévouement, l'affection, le soutien, et l'amour qu'elle m'a toujours témoigné.*

*-Mon père, en reconnaissance de tous les sacrifices, les efforts et la gentillesse qu'il m'a apporté.*

*Je les remercie pour leur confiance*

*« Que dieu leur accorde une très longue vie et une bonne santé »*

*-A mes frères et ma sœur et son époux qui sont toujours tenus à mes côtés dans des moments de faiblesse.*

*-A mes amis (e), ainsi que toute la promotion de BPAM-PN*

*ET A TOUT CEUX QUE J'AIME*

## Liste des abréviations

|         |   |
|---------|---|
| BPAM-PN | Biotechnologie des plantes aromatiques et médicinales et des produits naturels. |
| HE      | Huile essentielle.  |
| ZI      | Zone d'inhibition.  |
| DL50    | Dose létale 50.   |
| DL90    | Dose létale 90.   |
| GLM     | General Linear Model.   |
| CMI     | Concentration Minimale Inhibitrice.   |

## Liste des annexes

|           |   |
|-----------|---|
| ANNEXE 01 | <b>Tableau I</b> : Matériel de laboratoire et appareillage.   |
| ANNEXE 02 | <b>Tableau II</b> : Analyse de la variance de l'activité larvicide des huiles essentielles par le test GLM. |
| ANNEXE 03 | <b>Tableau III</b> : Les probits.   |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 : <i>Pelargonium graveolens</i> .   | 4  |
| Figure 2 : <i>Origanum glandulosum</i> .   | 6  |
| Figure 3 : Principales parties du corps du moustique adulte.   | 16 |
| Figure 4 : Structure d'une larve de <i>Culex</i> .   | 19 |
| Figure 5 : Cycle de développement du moustique.  | 21 |
| Figure 6 : Feuilles du <i>Pelargonium graveolens</i> .   | 27 |
| Figure 7 : Feuilles séchées d' <i>Origanum glandulosum</i> .   | 28 |
| Figure 8 : Localisation du gîte larvaire près du marché du centre de la ville de Chéraga, Alger.   | 29 |
| Figure 9 : Illustration de la méthode des aromatogrammes.  | 34 |
| Figure 10 : Gîte d'eau.  | 35 |
| Figure 11 : Bac en plastique.  | 35 |
| Figure 12 : Test de sensibilité des larves de moustique.   | 37 |
| Figure 13 : Dessin d'une larve de <i>Culex pipiens</i> .   | 49 |
| Figure 14 : Représentation graphique du pourcentage de mortalité des larves du <i>Culex pipiens</i> exposées à l'HE du <i>Pelargonium graveolens</i> .     | 50 |
| Figure 15 : Représentation graphique du pourcentage de la mortalité des larves du <i>Culex pipiens</i> exposées à l'HE de l' <i>Origanum glandulosum</i> . | 51 |
| Figure 16 : Activité larvicide des huiles essentielles du <i>Pelargonium graveolens</i> et de l' <i>Origanum glandulosum</i> en model GLM.                 | 52 |
| Figure 17 : DL 50 chez les larves de <i>Culex pipiens</i> 24h après traitement à l'huile essentielle du <i>Pelargonium graveolens</i> ..                   | 53 |
| Figure 18 : DL 50 chez les larves de <i>Culex pipiens</i> 24h après traitement à l'huile essentielle d' <i>Origanum glandulosum</i> .                      | 54 |

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1 : Position systématique du <i>Pelargonium graveolens</i> .  | 3  |
| Tableau 2 : Position systématique de l' <i>Origanum vulgare</i>   | 6  |
| Tableau 3 : Position systématique du <i>Culex pipiens</i>   | 20 |
| Tableau 4 : Les microorganismes utilisés lors de l'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique.  | 29 |
| Tableau 5 : Rendement moyen des HE du <i>Pelargonium graveolens</i> et de l' <i>Origanum glandulosum</i> .  | 39 |
| Tableau 6 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE du <i>Pelargonium graveolens</i> .   | 40 |
| Tableau 7 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de l' <i>Origanum glandulosum</i> .  | 40 |
| Tableau 8 : Paramètres physico-chimiques de l'HE du <i>Pelargonium graveolens</i> .   | 41 |
| Tableau 9 : Paramètres physico-chimiques de l'HE de l' <i>Origanum glandulosum</i> .  | 42 |
| Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition (ZI) du développement des différentes souches bactérienne traitées par les différentes concentrations d'HE du <i>Pelargonium graveolens</i> .           | 43 |
| Tableau 11 : les valeurs de la CMI de l'HE du <i>Pelargonium graveolens</i> vis-à-vis des germes testés.  | 45 |
| Tableau 12 : Diamètres des zones d'inhibition (ZI) du développement des différentes souches bactérienne isolées, en fonction des différentes concentrations en HE de l' <i>Origanum glandulosum</i> . | 46 |
| Tableau 13 : les valeurs de la CMI de l'HE de l' <i>Origanum glandulosum</i> vis-à-vis des germes testés.   | 48 |
| Tableau 14 : Taux de mortalité corrigé des larves de <i>Culex pipiens</i> traitées à l'HE du <i>Pelargonium graveolens</i> .  | 50 |
| Tableau 15 : Taux de mortalité corrigé des larves de <i>Culex pipiens</i> traitées à l'HE de l' <i>Origanum glandulosum</i> .   | 51 |
| Tableau 16 : Logarithmes décimaux des doses et les probits des taux de mortalité.   | 53 |

## Résumé

Notre étude a été menée afin d'évaluer l'activité antimicrobienne et larvicide de deux huiles essentielles issus du géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) et d'origan (*Origanum glandulosum*), l'extraction de nos deux huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation en utilisant seulement la partie aérienne (feuilles) de nos deux plantes, le rendement a été de 0.18% pour le géranium rosat et de 2.5% pour l'origan.

L'effet antimicrobien a été réalisé en adoptant la technique de l'aromatogramme, ce qui nous a permis de constater que l'origan a été plus efficace contre les souches utilisées que le géranium rosat, surtout vis-à-vis des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*, en donnant des zones d'inhibitions assez importantes.

Nous avons constaté aussi que les bactéries Gram + étaient plus sensibles vis-à-vis de nos deux huiles essentielles que les bactéries Gram -.

Concernant l'activité larvicide de nos deux huiles essentielles sur les larves de moustiques collectées et identifiées de l'espèce *Culex pipiens*, le taux de mortalité a été assez considérable après 24h pour l'huile essentielle d'origan avec une DL50 et DL90 de 1.870% et 2.182% respectivement, alors que le taux de mortalité pour le géranium rosat a été moins important que celui d'origan ainsi les DL50 et DL90 du géranium rosat ont été de 1.995% et 2.382% respectivement. Nos deux huiles essentielles ont montré un taux de mortalité de 100% après 48h pour toutes les concentrations utilisées.

**Mots clés :** *Pelargonium graveolens*, *Origanum glandulosum*, huiles essentielles, activité Antimicrobienne, activité larvicide.

## Abstract

Our study is lead in order to estimate the antimicrobial activity and larvae both essential oils issue to geranium roset (*Pelargonium graveolens*) and oregano (*Origanum glandulosum*), the extraction of the both essential oils is realized about the hydro distillation they are only used the aerial part (leaves) of the two plants, the produce is 0.18 % for the geranium roset and 2.5 % for the oregano.

The consequence of the antimicrobial are realized to adopt the technical of aromagramme, who are permitted to notice that oregano have the most adequate against stump utilized than geranium roset especially in relation to bacterial strain *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, to give the important enough inhibition area.

We have also established bacteria gram + have most sensitive in relation to the both essential oils bacteria gram - .

Concerning the activity of larva to the both essential oils, the mosquitoes larvae's collecting have correspond the sort of *Culex pipiens*, the percentage of mortality are enough considerable after 24 hours for essential oils oregano about DL 50 and DL 90 of 1.870 % and 2.182 % respectively, so the percentage of mortality for geranium roset have less important than oregano then DL50 and DL90 of geranium roset have 1.995 % and 2.382 % respectively, our both essential oils have essentially shown the percentage of mortality to 100 % after 48 hours for all concentration utilized.

Key words:

*Pelargonium graveolens*, *Origanum glandulosum*, essential oils; antimicrobial activities, larvae activities.

## ملخص

إن هدف دراستنا كان لتقييم النشاط الضد الميكروبي و اليرقي من خلال نوعين من الزيوت الأساسية " *Origanum glandulosum* و "*Pelargonium graveolens*".

استخراج هاذين الزيتين الأساسيين تم من خلال التقطير البخار باستعمال فقط الجزء الهوائي (الأوراق) لهاتين النباتين السابق ذكرهما، كان المردود بالنسبة ل-0.18% geranium و ل-25 % origan، مفعول الضد الميكروبي تم من خلال استعمال تقنية Aromatogramme ، هذا ما سمح لنا بملاحظة أن origan كان فعال ضد السلالات المستخدمة من geranium وخاصة بالنسبة لسلالات البكتيرية *Streptococcus pneumoniae* و *Staphylococcus aureus* ، الذين أعطوا مناطق مانعة كبيرة.

ولاحظنا أيضا أن البكتيريات Gram + كانت أكثر حساسية بالنسبة للزيوت الأساسية المستعملة من البيكتيريا - Gram.

بالنسبة لنشاط اليرقي للزيتين الأساسيين، اليرقات المجمعة تنطبق على النوع (*Culex pipiens*)، معدل الوفاة كانت معتبرة بعد 24 ساعة بالنسبة للزيوت الأساسية " *Origan* " مع DL50 و DL90 لـ1.870 و 2.18% على التوالي.

بينما كان معدل الوفاة لـ geranium أقل أهمية بالنسبة لـ origan و هكذا DL50 و DL90 لـ geranium كانا بالنسبة 1.995% و 2.382% على التوالي.

الزيتين الأساسيين بينوا لنا معدل وفاة بالنسبة 100% بعد 48 ساعة لكل التركيزات المستعملة.

## الكلمات الرئيسية:

*Origanum glandulosum* ، *Pelargonium graveolens* ، الزيوت الأساسية ، النشاط الميكروبي ، النشاط اليرقي.

## Sommaire

|   |    |
|---|----|
| <b>Introduction</b> .....                             | 1  |
| <b>Chapitre I : plantes et huiles essentielles</b>    |    |
| 1. Généralités sur les plantes étudiées .....         | 3  |
| 1.1. Géranium rosat .....                             | 3  |
| 1.1.1. Histoire .....                                 | 3  |
| 1.1.2. Morphologie .....                              | 4  |
| 1.1.3. Culture et phénologie .....                    | 5  |
| 1.2. Origan .....                                     | 6  |
| 1.2.1. Histoire.....                                  | 6  |
| 1.2.2. Morphologie.....                               | 7  |
| 1.2.3. Culture et phénologie.....                     | 7  |
| 2. Généralités sur les huiles essentielles.....       | 8  |
| 2.1. Localisation et lieu de synthèse.....            | 8  |
| 2.2. Rôle physiologique .....                         | 9  |
| 2.3. Composition chimique .....                       | 9  |
| 2.3.1. L'huile essentielle du géranium rosat.....     | 9  |
| 2.4. Notion de chémotype.....                         | 11 |
| 2.5. Méthodes d'extraction .....                      | 11 |
| 2.5.1. Distillation.....                              | 11 |
| 2.5.2. Extraction par fluides supercritiques .....    | 12 |
| 2.5.3. Extraction assistée par micro-ondes .....      | 13 |
| 2.5.4. Extraction à froid .....                       | 13 |
| 2.5.5. Extraction par solvants organique .....        | 13 |
| 2.6. Activité antimicrobienne .....                   | 13 |
| 2.6.1. Activité antibactérienne .....                 | 14 |
| 2.6.2. Activité antifongique .....                    | 14 |
| 2.6.3. Activité antivirale.....                       | 15 |
| 2.7. Activité insecticide : mécanismes d'action ..... | 15 |
| 2.8. Toxicité des huiles essentielles .....           | 15 |

## Chapitre II : Moustiques et microorganismes étudiés

|   |    |
|---|----|
| 1. Généralité sur les <i>Culicidae</i> .....                | 16 |
| 1.2. Morphologie .....                                      | 16 |
| 1.2.1. L'adulte .....                                       | 16 |
| 1.2.2. Les œufs .....                                       | 18 |
| 1.2.3. La larve .....                                       | 18 |
| 1.2.4. La nymphe .....                                      | 19 |
| 1.3. Position systématique .....                            | 20 |
| 1.4. Le cycle de développement .....                        | 20 |
| 1.4.1. La phase aérienne.....                               | 21 |
| 1.4.2. La phase aquatique.....                              | 21 |
| 1.5. Le complexe <i>Culex pipiens</i> .....                 | 22 |
| 1.6. Principales nuisances causés par le <i>Culex</i> ..... | 23 |
| 1.6.1. La pique .....                                       | 23 |
| 1.6.2. La transmission des maladies .....                   | 23 |
| 2. Généralité sur les microorganismes utilisés .....        | 24 |
| 2.1. Les bactéries Gram positifs .....                      | 24 |
| 2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....                   | 24 |
| 2.1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....                | 24 |
| 2.1.3. <i>Enterococcus faecalis</i> .....                   | 25 |
| 2.2. Les bactéries Gram négatif .....                       | 25 |
| 2.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....                        | 25 |
| 2.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                  | 26 |
| 2.3. Levures .....  | 26 |
| 2.3.1. <i>Candida albicans</i> .....                        | 26 |

## Chapitre III : Matériel et méthode

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 1. Matériel utilisé.....              | 27 |
| 1.1. Matériel non biologique .....    | 27 |
| 1.2. Matériel biologique.....         | 27 |
| 1.2.1. Matériel végétal .....         | 27 |
| 1.2.2. Matériel entomologique .....   | 28 |
| 1.2.3. Microorganismes utilisés ..... | 29 |
| 2. Méthodes .....                     | 29 |

|  |    |
|--|----|
| 2.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation .....  | 29 |
| 2.2. Propriétés physicochimiques .....   | 30 |
| 2.2.1. Rendement en huile essentielle .....  | 30 |
| 2.2.2. Caractéristique de l'HE .....   | 30 |
| 2.2.3. Les indices physicochimiques .....  | 30 |
| 2.3. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du <i>Pelargonium graveolens</i> et de l' <i>Origanum glandulosum</i> .....                      | 33 |
| 2.3.1. Technique en milieu solide (Aromatogramme) .....  | 33 |
| 2.3.2. Préparation des dilutions .....   | 35 |
| 2.4. Etude de l'activité Larvicide de l'huile essentielle du <i>Pelargonium graveolens</i> et de l' <i>Origanum glandulosum</i> .....                            | 35 |
| 2.4.1. Prospection des gîtes .....   | 35 |
| 2.4.2. Collecte des larves .....   | 35 |
| 2.4.3. Détermination des espèces .....   | 36 |
| 2.4.4. Elevage .....   | 37 |
| 2.4.5. Evaluation de l'efficacité de l'huile essentielle du <i>Pelargonium graveolens</i> et de l' <i>Origanum glandulosum</i> sur les larves de moustiques..... | 37 |
| 2.4.6. Evaluation des taux de mortalités corrigées des larves induites par les différents traitements .....  | 37 |
| 2.4.7. Evaluation de l'efficacité des produits testés par des analyses statistiques.....   | 38 |

## **Chapitre IV : Résultats et discussion**

|   |    |
|---|----|
| 1. Rendement en HE .....  | 39 |
| 2. Etude analytique des HE du <i>Pelargonium graveolens</i> et de l' <i>Origanum glandulosum</i> .....                  | 40 |
| 2.1. Caractéristiques organoleptiques .....   | 40 |
| 2.2. Caractéristiques physico-chimiques .....   | 40 |
| 2.2.1. <i>Pelargonium graveolens</i> .....  | 40 |
| 2.2.2. <i>Origanum glandulosum</i> .....  | 41 |
| 3. Evaluation de l'activité antimicrobienne du <i>Pelargonium graveolens</i> et de l' <i>Origanum glandulosum</i> ..... | 42 |
| 3.1. Aromatogramme .....  | 42 |
| 3.2. Interprétation et discussion des résultats .....   | 43 |
| 3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....   | 45 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.4. Interprétation et discussion des résultats .....   | 47        |
| 3.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....   | 48        |
| 4. Evaluation de l'activité insecticide du <i>Pelargonium graveolens</i> .....  | 49        |
| 4.1.1. Identification du genre de l'insecte étudié (moustique) .....  | 49        |
| 4.1.2. Identification de l'espèce .....   | 49        |
| 4.1.3. Estimation du taux de la mortalité corrigée (MC) des larves de <i>Culex pipiens</i> traités par l'HE du <i>Pelargonium graveolens</i> et de l' <i>Origanum glandulosum</i> ..... | 50        |
| 4.1.4. Interprétation et discussion .....   | 51        |
| 4.1.5. Analyse statistique .....  | 52        |
| 4.1.6. Calcul des doses létales (DL50) du <i>Pelargonium graveolens</i> et de l' <i>Origanum glandulosum</i> .....  | 53        |
| <b>Conclusion</b> .....   | <b>55</b> |
| <b>Références bibliographiques</b> .....  | <b>57</b> |
| <b>Annexes</b>  |           |

Depuis que le monde est monde, des organismes insectes, acariens, bactéries, champignons, et autres minent la vie de l'Homme, qui tente souvent de les combattre. La seule méthode de lutte contre ces agents était la voie chimique débutée dès le XIX<sup>e</sup> siècle, les plantes ont été utilisées à des fins alimentaires et thérapeutiques.

Avec la découverte et la prise de conscience de résistance chez les insectes et les microorganismes visés par les pesticides chimiques et les antibiotiques, de nombreuses initiatives ont été déployées depuis plusieurs années pour développer des méthodes alternatives dont les méthodes biologiques revenues alors à l'avant-scène.

Par ailleurs, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 4000 sont des plantes médicinales, ce qui constitue 90 % de la médecine traditionnelle en Afrique (OMS, 2003).

Durant les récentes décennies, les huiles essentielles et leurs constituants à vertus thérapeutiques sont utilisés dans la médecine moderne, pour leur richesse en composés biologiquement actifs possédant diverses propriétés, antibactériennes, antifongiques, antioxydants, insecticides etc. (BRUNETON, 1999). Citons par exemple le taxol issu de *Taxus baccata* L. (*Taxaceae*) pour ses propriétés anticancéreuses remarquables (cancer de l'ovaire et cancer du sein) et de l'artémisinine isolée d'*Artemisia annua* L. (*Asteraceae*) pour ses propriétés antipaludiques (HOSTETTMANN, 1997). En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques. Le thymol, par exemple, est employé en soins Dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques (PAULI, 2001).

De notre côté, et dans la perspective de rechercher d'autres produits alternatifs biodégradables et inoffensifs à l'homme et à l'environnement, où les pratiques de contrôle à base de pesticides de synthèse et d'antibiotiques s'avèrent intensives, nous avons étudié l'effet biocide de deux traitements à base d'huiles essentielles extraits de la partie aérienne de géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) et de l'*Origanum glandulosum*, connues en Algérie et réputée pour leurs diverses vertus, sur les abondances des larves d'une espèce de moustique *Culex pipiens*, le plus fréquent dans le monde et qui est d'après plusieurs auteurs KARBOUA et MERNIZ (1997), BOUDRIHEM (2001), LOUNACI (2003), HAMAIDIA (2004), l'espèce la plus fréquente en Algérie et responsable de la transmission de nombreuses maladies telles que la Fièvre de la Vallée du Rift et le Virus West Nile. Aucun travail n'a été réalisé

concernant l'activité larvicide des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* vis-à-vis des larves de moustiques.

L'une des méthodes de lutte utilisées contre cet insecte dans la campagne de lutte antivectorielle par l'organisation mondiale de santé (OMS) est l'utilisation des produits chimiques comme insecticides dont les plus utilisées appartiennent aux Organophosphorés, Organochlorés, Carbamates et Pyréthrinoides de synthèse. Ces préparations bien qu'elles soient révélées très efficace sur les moustiques, elles présentent plusieurs inconvénients et peuvent être à l'origine de divers problèmes sanitaires et environnementaux (AQUINTY et al, 2006). Par ailleurs, certains produits chimiques utilisés dans cette lutte sont devenus moins efficaces du fait de la résistance développée par certaines espèces de moustiques (OMS, 1999).

Dans le même ordre d'idée, notre deuxième question a été de savoir si l'huile essentielle des deux plantes manifeste un effet antimicrobien pour contrôler certains microorganismes pathogènes (Bactéries, levures), représentant un grand danger pour la santé de l'Homme et dont certains ont développés des résistances vis-à-vis des antibiotiques.

Notre travail s'est étalé sur une période de 6 mois de Janvier jusqu'à juin 2015, différentes expérimentation ont été effectués dans les structures suivantes :

- Laboratoire de BPAM-PN du département de biotechnologie de l'université Blida I ou l'extraction des huiles essentielles et l'étude de leur effet larvicide sur le moustique (*Culex pénéien*) ainsi que l'identification de ce dernier ont été effectués.
- Laboratoire de bactériologie de l'Hôpital Frantz fanon ou les tests de l'effet antimicrobien de nos huiles essentielles ont été appliqués.
- Laboratoire de chimie organique du département de chimie industriel de l'université Blida I, pour la caractérisation physico-chimique de nos huiles essentielles.

## 1. Matériel utilisé

**1.1. Matériel non biologique :** L'ensemble du matériel non biologique est illustré dans l'annexe n°1.

### 1.2. Matériel biologique

#### 1.2.1. Matériel végétal

Notre travail a porté sur deux plantes qui sont :

##### a. Le *Pelargonium graveolens*

Le choix de cette plante est dû au fait qu'elle soit reconnu comme un bon répulsif aux moustiques et un bon antimicrobien. Nous n'avons utilisé que les parties aériennes séchés du géranium rosat (feuilles) pour l'extraction des huiles essentielles, qui a été récolté en fin novembre au niveau du jardin d'essai (Alger).



Figure 6: Feuilles du *Pelargonium graveolens*.

**b. L'*Origanum glandulosum***

Cette plante a été choisie pour étudier l'effet insecticide méconnu de l'huile essentielle de l'origan sur les larves de moustique (*Culex pipiens*). Seules les feuilles séchées ont été utilisées pour l'extraction des HE achetée et provenant de la région de Sétif, d'après IETSWAART (1980), l'*Origanum glandulosum* est une espèce endémique Algérienne, qui pousse dans tout le Tell (hauts plateaux) et plus précisément à Sétif ce qui nous a facilité l'identification de notre espèce.



Figure 7 : Feuilles séchées d'*Origanum glandulosum*.

Aucun travail n'a été réalisé concernant l'activité larvicide des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* vis-à-vis des larves de moustiques.

Ces deux plantes ont été choisies aussi pour une étude comparative de leur effet antimicrobien connu et assez important.

**1.2.2. Matériel entomologique**

Les larves de moustiques utilisées sont du genre *Culex* et plus précisément de l'espèce *Culex pipiens*, collectés en fin avril au niveau d'un gîte d'eau près du marché du centre de la ville de Chéraga, Alger (Figure 6).

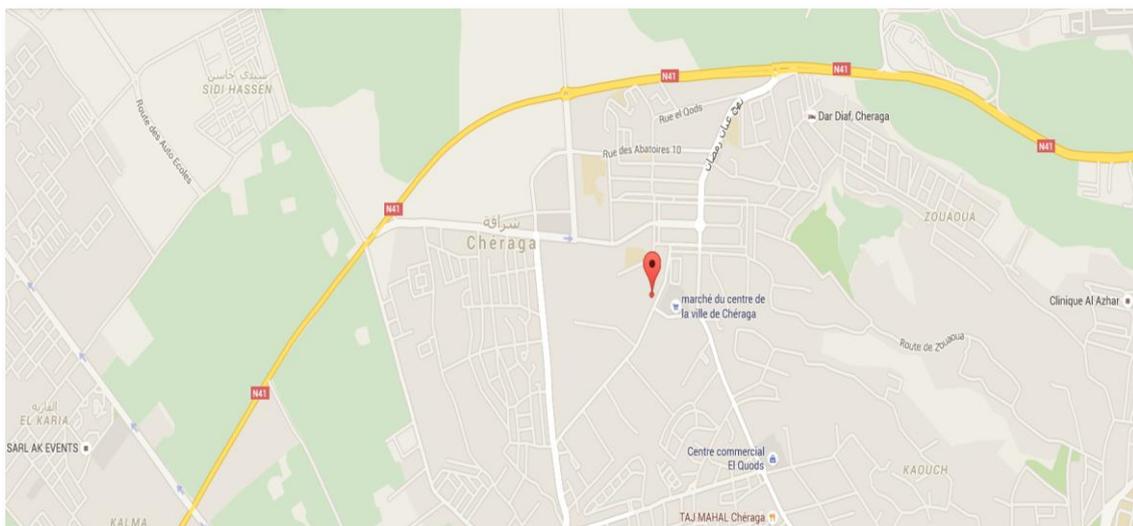


Figure 8 : Localisation du gîte larvaire près du marché du centre de la ville de Chéraga, Alger.

### 1.2.3. Microorganismes utilisés

Le choix des microorganismes a été porté sur 6 bactéries et 1 levure fréquentes en pathologie humaine. Par leur résistance à divers agents antimicrobiens, ces microorganismes constituent un problème majeur de santé publique.

**Tableau 4 :** Les microorganismes utilisés lors de l'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique.

|                                | Souches                                  | N° ATCC            |
|--------------------------------|--|--------------------|
| <b>Bactérie à Gram positif</b> | <i>Staphylococcus aureus</i> (resistant) | 43300              |
|                                | <i>Staphylococcus aureus</i> (sensible)  | 25923              |
|                                | <i>Streptococcus pneumoniae</i>          | Isolé d'un patient |
|                                | <i>Enterococcus faecalis</i>             | Isolé d'un patient |
| <b>Bactérie à Gram négatif</b> | <i>Escherichia coli</i>                  | 25923              |
|                                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>            | 27853              |
| <b>Levure</b>                  | <i>Candida albicans</i>                  | Isolé d'un patient |

## 2. Méthodes

### 2.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

#### • Principe

La matière végétal est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées

dans un réfrigérant et l'HE se sépare de l'hydrolysât par simple différence de densité. L'HE étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysât (LUCCHESI, 2005).

#### • Procédé

100g de feuilles sèches pour l'*Origanum glandulosum* et 40g de feuilles sèches pour le *Pelargonium graveolens* sont mis dans un ballon à fond rond de 1000ml, en additionnant 600 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pour une durée de 2h à 2h.30min. La vapeur d'eau entraîne avec l'HE, elle est ensuite condensée en passant par le condensateur. Le liquide recueilli résulte en un distillât avec une couche d'huile mine à la surface. Après la récupération dans des eppendorfs, l'hydrolât est enlevé en utilisant une seringue stérilisé et seul l'HE est gardé dans les eppendorfs.

## 2.2. Propriétés physicochimiques

### 2.2.1. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport de la masse d'huile essentielle et de la matière végétale fraîche utilisée. Il est exprimé en pourcentage (%).

$$R\% = \frac{M_{HE}}{M_{MV}} \times 100$$

Où :

R% : Rendement en huile essentielle.

M<sub>HE</sub> : Masse de l'huile essentielle (g).

M<sub>MV</sub> : Masse de la matière végétale sèche (g).

### 2.2.2. Caractéristique de l'HE

La caractérisation d'une essence consiste à :

- Vérifier ces caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur, saveur).
- Déterminer ses indices physicochimiques (indice d'acide, indice d'ester, pouvoir rotatoire, et indice de réfraction).

### 2.2.3. Les indices physicochimiques

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physicochimiques sont celles indiquées par le recueil et normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2000).

### 2.2.3.1. Indice d'acide (IA)

Nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle (AFNOR, 2000).

L'indice d'acide permet de vérifier la qualité d'une HE, notamment en ce qui concerne sa dégradation avec le temps durant le stockage. Cette méthode convient pour toutes les HE, sauf pour celles qui sont riches en lactones.

#### • Principe

Les acides libres sont neutralisés par une solution éthanolique titrés d'hydroxyde de potassium.

#### • Mode opératoire

Introduire 2g de notre HE dans un ballon de 100 ml, puis ajouter 5 ml d'éthanol neutralisé et 5 gouttes au maximum d'indicateur coloré, utiliser soit : la solution de phénolphthaléine, soit la solution de rouge de phénol, si l'HE à analyser renferme des groupes phénoliques.

Titrer le liquide avec la solution d'hydroxyde de potassium contenue dans la burette et continuer l'addition jusqu'à l'obtention d'un virage de la couleur de la solution persistant pendant 30 secondes.

Noter le (V) de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé, l'indice d'acide (IA) est donné par la formule :

$$IA = \frac{(V \times C \times 56.11)}{M}$$

Où :

V : Volume en millilitres, de solution d'hydroxyde de potassium, utilisé pour le titrage.

C : Concentration exacte, en moles par litre, de la solution d'hydroxyde de potassium.

M : Masse, en grammes de l'échantillon.

56.11 : équivalent en gramme de KOH.

### 2.2.3.2. Indice d'ester (IE)

Nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires à la neutralisation des acides libérés par l'hydroxyde des esters contenus dans 1 g d'HE (AFNOR, 2000).

• **Principe**

Hydroxyde 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'alcalin par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

• **Mode opératoire**

Introduire 2g de notre HE dans un ballon de 100 ml à 250ml, puis, à l'aide d'une burette de 25 ml, ajouter 25 ml de la solution d'hydroxyde de potassium ainsi que des fragments de pierre ponce ou de porcelaine.

- Selon l'HE analysée, adapter le tube en verre ou le réfrigérant à reflux au ballon, et le placer sur le bain d'eau bouillante.

- Maintenir le ballon sur le bain d'eau pendant une durée de temps.

- Laisser refroidir le ballon et démonter le tube.

- Ajouter 20ml d'eau, puis 5 gouttes de solution de phénophtaléine ou bien, dans le cas où l'HE contient des groupes phénoliques, 5 gouttes de solution de rouge phénol.

En parallèle à la détermination, effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions opératoires et en utilisant les mêmes réactifs.

L'indice d'ester (IE) est donné par la formule :

$$IE = \frac{28.05(V_0 - V_1)}{M} - IA$$

Où :

$V_0$  : Volume, en millilitres de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour l'essai à blanc.

$V_1$  : Volume, en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour la détermination.

M : Masse en gramme, de l'HE.

IA : Valeur de l'indice d'acide.

28.05 : La constante.

**2.2.3.2. L'indice de réfraction**

L'indice de réfraction est déterminé par une simple lecture directe à l'aide d'un refractomètre ABBIE en employant la lumière du jour, en fixant la température à 20°C

Maintenue à l'aide d'un thermostat (AFNOR, 2000).

### **2.3. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *Pelargonium graveolens* et de l'*Origanum glandulosum***

Cette étude consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis à nos deux HE (*Pelargonium graveolens* et *Origanum glandulosum*), à l'aide d'une technique en milieu solide appelée Aromatogramme, en procédant à des tests sur une sélection de souches de référence bactérienne et fongique connues, et qualifiées comme dangereuses pour l'Homme et l'Animal.

#### **2.3.1. Technique en milieu solide (Aromatogramme)**

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, l'antibiogramme (BENJILALI et al, 1986 ; SATRANI et al, 2007). Dans cette méthode, nous utilisons des disques de 6mm de diamètre provenant du laboratoire d'hygiène de l'hôpital Faroudja (Blida), imprégnés d'une quantité de 5 µl d'HE. Le disque sera déposé au centre d'une boîte de pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne. L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques par des extraits aromatiques.

#### **• Préparation de l'inoculum**

- A partir d'une culture pure et récente de germes (bactéries ou levures) à tester sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une pipette Pasteur, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

- Décharger la pipette Pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- Agiter la suspension bactérienne (bien homogénéiser) à l'aide d'un agitateur.
- L'ensemencement doit se faire moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

#### **• Ensemencement**

- Les milieux des cultures utilisés sont : Muller-Hinton (MH) pour les bactéries, et Sabouraud (SAB) pour les levures.

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer et le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération quatre fois, en tournant la boîte de pétri de 45° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.

- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

#### • Dépôt des disques

- A l'aide d'une pince stérile, nous avons prélevé à chaque fois un disque stérile. Ce dernier est imbibé avec l'HE en mettant seulement en contact le bout du disque avec l'HE. Celle-ci est absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque.

- Nous avons déposé les disques sur la surface du milieu de culture.

- Les boîtes sont laissées diffuser pendant 1h30.

- Les boîtes sont ensuite mises à incuber à l'étuve à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les champignons.

#### • Lecture des résultats

La lecture des résultats consiste à observer :

- La présence d'une zone claire autour du disque : présence d'une activité inhibitrice.

- L'absence d'une zone claire autour du disque : indique l'absence d'activité inhibitrice.

- On parlera de CMI là où aucune croissance visible n'est constatée au niveau des spots tout en sachant que la présence d'une ou deux colonies n'est pas prise en considération.

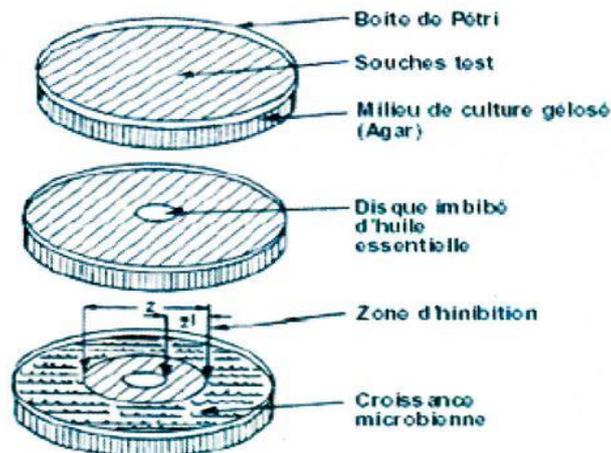


Figure 9 : Illustration de la méthode des aromagrammes (ZAIKA, 1988).

- Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibitions et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HE (PONCE et al, 2003).

• Non sensible (-) ou résistante : < 8 mm.

• Sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm.

- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

### 2.3.2. Préparation des dilutions

On introduit aseptiquement 0.5 ml de l'HE à l'aide d'une pipette stérile dans un tube stérile contenant 9.5 ml de tween 20 tout en agitant le tube pour homogénéiser les deux phases du milieu. Cette suspension constitue la dilution 5%.

- Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, 5 ml de la dilution (5%) dans un tube à vis stérile contenant 5 ml de tween 20. Cette dilution est alors au 2.5 %.

- Suivre la même méthode jusqu'à l'obtention d'une dilution de 0.625 %.

## 2.4. Etude de l'activité Larvicide de l'huile essentielle du *Pelargonium graveolens* et de l'*Origanum glandulosum*

### 2.4.1. Prospection des gîtes :

Il s'agit de prospecter les lieux à la recherche de l'existence de collections d'eau, grandes ou petites, naturelles ou artificielles, potentiellement favorable au développement des larves des moustiques. Toutes les collections d'eau stagnantes ont été considérées comme des gîtes larvaires potentiels et ont été prises en considération.



Figure 10 : Gîte d'eau



Figure 11 : Bac en plastique

### 2.4.2. Collecte des larves

Les larves ont été collectées en fin avril au niveau d'un gîte d'eau (Figure 10) près du marché du centre de la ville de Chéraga, Alger. La méthode de collecte utilisée est celle du « Dipping » ou trempage. (PAPRIEROK et al, 1975). Elle consiste à prélever l'eau du gîte à

l'aide d'une louche ou d'un récipient, nous avons plongé le récipient rapidement dans l'eau plusieurs fois ou nous avons après versé le contenu dans un bac en plastique (Figure 11).

### 2.4.3. Détermination des espèces

L'identification des espèces de moustiques collectés a été réalisée au niveau du laboratoire de BPAM-PN du département de Biotechnologie de l'université Saad Dahleb (Blida), en plaçant la larve entre lame et lamelle et en l'observons sous microscope photonique G x10, x40, tout en s'aidant des clés d'identification des larves proposées par RIOUX (1958).

#### 2.4.3.1. Identification du genre de l'insecte étudié (moustique)

##### a. Tête

- La longueur de l'antenne : antenne longue (L= la longueur de la tête)
- Structure hypostomale (suture maxillaire) : complète ou nettement marquée.

##### b. Abdomen

- L'orifice respiratoire s'ouvre à l'extrémité d'un tube cylindrique.
- Ornementation du siphon avec peigne basale et plusieurs touffes de soies ventrale.

D'après les résultats d'identification du genre, cette espèce appartient au genre : *Culex*

#### 2.4.3.2. Identification de l'espèce

##### a. Tête

- Le premier critère d'identification de l'espèce est l'insertion de la soie antennaire 3-A dans ce cas la soie antennaire se situe à proximité 4-A.

- Le mentum forme avec une paire de mandibule armée de dent sur leur bord distal l'appareil masticateur, le nombre de dents du mentum se différent d'une espèce à une autre et notre espèce possède 8 dent ou plus de part et autre de la dent médiane.

##### b. Abdomen

- Concernant la forme du siphon, il existe plusieurs formes : à bord droits, à bords convexes, à bord concaves ou a bord arqué dans notre cas, notre espèce avait un siphon à bord droit.

- Disposition des soies 1-S du siphon des soies ventrales et latérales.
- Nombre de branches de la soie 1-S du siphon possède de 2 à 5 branches.
- Orientation de la dent distale du peigne siphonal est de 3 à 5 denticules basaux.
- Et enfin le dernier qui a permis d'identifier notre espèce est le nombre de branches de la soie caudale 1-X qui possède 1 branche.

#### 2.4.4. Elevage

L'élevage a duré 3 jours, le temps de les transporter au laboratoire de BPAM-PN. Les larves sont nourries avec de la nourriture pour poisson et dont la température ambiante varie entre 20°C et 25°C.

#### 2.4.5. Evaluation de l'efficacité de l'huile essentielle du *Pelargonium graveolens* et de l'*Origanum glandulosum* sur les larves de moustiques

A partir des dilutions déjà préparées pour l'effet antimicrobien, nous avons utilisé les dilutions suivantes : 5%, 2.5%, 0.625% de chaque plante.

- Pour l'HE du *Pelargonium graveolens* et d'*Origanum glandulosum*

10 larves ont été prélevées à l'aide d'une pipette pasteur et mises dans des gobelets de 5 cm de diamètre, contenant chacun 99ml d'eau du gîte (par introduction d'un millilitre de chaque dilution dans les gobelets (précédemment préparés). Une répétition a été réalisée pour chaque dilution.

- Pour le témoin :

Le témoin contient 99ml d'eau du gîte et 1ml de tween 20.



Figure 12 : Test de sensibilité des larves de moustique.

#### 2.4.6. Evaluation des taux de mortalités corrigées des larves induites par les différents traitements

Après un temps de contact de 24h, nous dénombrons les larves mortes. Nous avons calculé le pourcentage de mortalité chez le témoin et les traités en utilisant la formule :

$$\text{Mortalité observé} = \frac{\text{Nombre d'individus morts}}{\text{Nombre total des individus}} \times 100$$

Nous avons calculé après le pourcentage de mortalité corrigé selon la formule d'Abbott 1925 (TAPONDJOU et al, 2003) :

$$MC \frac{M2 - M1}{100 - M1} \times 100$$

M1 : Pourcentage de mortalité dans le témoin.

M2 : Pourcentage de mortalité dans le lot traité.

MC : Pourcentage de mortalité corrigé.

Le test est considéré valide si le pourcentage de mortalité chez les témoins est inférieur à 5% ou compris entre 5% et 20 %.

Si la mortalité chez les témoins excède 20 %, le test est invalide et doit être recommencé.

#### **2.4.7. Evaluation de l'efficacité des produits testés par des analyses statistiques**

##### **2.4.7.1. Analyse de variance (modèle GLM)**

L'analyse de la variance permet de déterminer l'influence des facteurs étudiés ou des intercalions entre les facteurs. Dans notre cas nous avons effectué cette analyse pour comparer l'effet des huiles essentielles en fonction des doses et du temps (jours), à l'aide du logiciel « SYSTAT VERSION 7.0, COPYRIGHT (C) 1997, SPSS INC ».

##### **2.4.7.2. Calcule de la dose létale (DL50) et (DL90)**

Nous avons calculé la DL50, la dose provoquant 50% de mortalité dans la population étudiée ainsi que la DL90, pendant un temps donné, nous avons transformé les pourcentages de mortalités corrigées en probits et les doses en logarithme décimal (CAVELIER, 1962). Ainsi nous avons établi par le logiciel EXCEL des droites de régression type  $Y = ax + b$

Y : Taux de mortalité à 50%.

a = La pente.

x = la dose recherché à 50% de mortalité.

b = Valeur de l'axe des donnés.

### 1. Rendement en HE

L'extraction d'huile essentielle du *Pelargonium graveolens* et de l'*Origanum glandulosum* réalisée par hydro distillation a donné des rendements exprimés en pourcentage regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau 5** : Rendement moyen des HE du *Pelargonium graveolens* et de l'*Origanum glandulosum*.

| Espèce                        | Rendement HE % |
|-------------------------------|----------------|
| <i>Pelargonium graveolens</i> | 0.18%          |
| <i>Origanum glandulosum</i>   | 2.5 %          |

Le rendement en HE du *Pelargonium graveolens* est légèrement élevé (0,18%) comparé à celui rapporté dans les normes AFNOR (0,15%) (AFNOR, 2000). Ce taux est relativement faible comparé à celui rapporté par BOUKHATEM et *al.*, (2010) (0,2%) obtenu à partir du *Pelargonium graveolens* issue de la région de la Chifa. Cette différence est vraisemblablement due au site et à la période de récolte du *Pelargonium graveolens* effectuée en fin novembre au niveau du jardin d'essai (Alger) pour notre échantillon et au mois de mai au niveau de la région de la Chifa pour l'échantillon de Boukhatem et *al.* (2010), période favorable pour une photopériode optimale propice à la biosynthèse des HE. Ce rendement a montré aussi une variation selon l'origine de la plante en France (0,15%), Portugal (0,2%), USA (0,18%) et au Maroc (0.1%) (RODOLFO et *al.*, 2006).

Aussi, ce rendement est tributaire de plusieurs facteurs: la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation, le régime des vents, les écartements entre plants (un espacement de 60x30 cm avec culture intercalaire (menthe) pour un meilleur rendement (RAO et *al.*, 2002), le désherbage ou encore l'apport de la paille, les amendements minéraux qui contribuent à l'augmentation de la masse végétale et donc celui du rendement en HE, notamment, les engrais organiques en combinaison avec l'azote (160Kg/ha), le temps de séchage (DEMARNE,1985 et GOMES, 2004), la technique d'extraction et le cycle végétatif qui influe qualitativement et quantitativement sur le rendement en HE.

Pour celui de l'HE l'*Origanum glandulosum* qui est de 2,5%, il est supérieur à celui obtenus (0,76%) par FROUHAT et LAHCINI en 2013 à Ouargla durant le Mois d'Avril et

supérieur à celui de l'*Origanum vulgare* obtenu par CASSIANO et al, (2007) qui est de 1.33% et qui peut atteindre 4,8% selon BENDAHOU et al, (2008).

## 2. Etude analytique des HE du *Pelargonium graveolens* et de l'*Origanum glandulosum*

### 2.1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques des deux HE sont mentionnées dans les tableaux (6) et (7):

**Tableau 6** : Comparaison des caractéristiques organoleptiques de l'HE du *Pelargonium graveolens*.

| Caractéristiques | Notre étude (2015)     | AFNOR (2000)                 |
|------------------|------------------------|------------------------------|
| Aspect           | Liquide, limpide       | Liquide, limpide, mobile     |
| Couleur          | Jaune à jaune verdâtre | Jaune ambré à jaune verdâtre |
| Odeur            | Citronnée et Rosée     | Rosée, menthée               |

Les caractéristiques organoleptiques de l'HE du *Pelargonium graveolens* sont en conformité avec celle défini par les normes AFNOR (2000).

**Tableau 7** : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de l'*Origanum glandulosum*.

| Caractéristiques | Notre étude (2015)        | GARNIER (1961)            |
|------------------|---------------------------|---------------------------|
| Aspect           | Liquide                   | Liquide                   |
| Couleur          | Jaune foncé à jaune pâle  | Jaune foncé à brun claire |
| Odeur            | Piquante, Très aromatique | Très aromatique           |

Les Caractéristiques organoleptiques de l'HE de l'*Origanum glandulosum* sont en conformité à celle défini par GARNIER (1961).

### 2.2. Caractéristiques physico-chimiques

#### 2.2.1. *Pelargonium graveolens*

Les résultats des paramètres physico-chimiques de l'HE du *Pelargonium graveolens* sont mentionnés dans le tableau (8):

**Tableau 8** : Paramètres physico-chimiques de l'HE du *Pelargonium graveolens*.

| Critère              | Notre étude (2015) | AFNOR (2000) |
|----------------------|--------------------|--------------|
| Densité relative     | 0.881              | 0.884        |
| Indice de réfraction | 1.468              | 1.461-1.470  |
| Indice d'acide       | 8.976              | <10          |
| Indice d'ester       | 66.9               | 53-76        |

Les paramètres physico-chimiques du *Pelargonium graveolens* sont conformes aux normes AFNOR sauf pour le critère de densité qui est légèrement moins fort. Cependant, ils sont différents de ceux de la région de la Chifa (Boukhatem et al., 2010). A partir de ces valeurs, il en ressort que toutes ces constantes étant influencées par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les pratiques culturales. Cela fait partie de la complexité de la notion de chémotype.

Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. L'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres. Dans notre étude, cet indice, certes est dans les normes, demeure un peu élevé. Cela peut trouver une explication dans la dégradation de l'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation, ce qui diminue de sa qualité. Inversement, un IA inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres). Cet indice est aussi supérieur à celui de l'HE de la région de la Chifa. Ce qui confirme l'influence de plusieurs facteurs tels que l'origine et la période de récolte.

### 2.2.2. *Origanum glandulosum*

Il n'existe pas de normalisation AFNOR concernant l'Origan. Les résultats des paramètres physico-chimiques de l'HE de *Origanum glandulosum* sont mentionnés dans le tableau (9):

**Tableau 9** : Paramètres physico-chimiques de l'HE de *Origanum glandulosum*.

| Critère              | Notre étude (2015) |
|----------------------|--------------------|
| Densité relative     | 1.105              |
| Indice de réfraction | 1.507              |
| Indice d'acide       | 14.586             |
| Indice d'ester       | 4.56               |

La densité de l'HE d'*Origanum glandulosum* (1.105) est légèrement supérieur à celle définie par GARNIER (1961) qui varie entre (0.864-0.906, l'indice de réfraction (1.507) est assez proche de celui trouvé par ABDULLAH (2009) pour l'*O. vulgare* qui est de 1.499, l'indice d'acide d'*Origanum glandulosum* (14.586) est bien plus supérieur à celui trouvé dans la fiche technique de l'HE de l'*Origanum compactum* du Maroc qui est égale à 2 et l'indice d'ester (4.56) est supérieur à celui mentionné dans la fiche technique de l'HE de l'*Origanum compactum* du Maroc qui est égale à 3.

La variation de ces paramètres physico-chimiques des deux huiles essentielles est influencée par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les conditions de culture de la plante. Cela fait partie de la complexité de la notion chémotype (RODOLFO-JULIANI et al, 2006).

### 3. Evaluation de l'activité antimicrobienne du *Pelargonium graveolens* et de l'*Origanum glandulosum*

#### 3.1. Aromatogramme

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition du développement des différentes souches bactérienne traitées par l'HE du *Pelargonium graveolens* et de l'*Origanum glandulosum* sont regroupés dans les tableaux (10) et (12).

**Tableau 10** : Diamètres des zones d'inhibition (ZI) du développement des différentes souches bactérienne traitées par les différentes concentrations d'HE du *Pelargonium graveolens*.

|                                | Souches                                   | Dilutions | ZI Ø  | Sensibilité |
|--------------------------------|---|-----------|-------|-------------|
| <b>Bactérie à Gram positif</b> | <i>Staphylococcus aureus</i> (résistante) | 0 %       | 14 mm | +           |
|                                |   | 5%        | -     | R           |
|                                |   | 2,5%      | -     | R           |
|                                |   | 1,25%     | -     | R           |
|                                |   | 0,625%    | -     | R           |
|                                | <i>Staphylococcus aureus</i> (sensible)   | 0 %       | 18 mm | ++          |
|                                |   | 5%        | -     | R           |
|                                |   | 2,5%      | -     | R           |
|                                |   | 1,25%     | 9 mm  | +           |
|                                |   | 0,625%    | 11 mm | +           |
|                                | <i>Streptococcus pneumoniae</i>           | 0 %       | -     | R           |
|                                |   | 5%        | 13 mm | +           |
|                                |   | 2,5%      | 16 mm | ++          |
|                                |   | 1,25%     | 16 mm | ++          |
|                                |   | 0,625%    | 15 mm | ++          |
|                                | <i>Enterococcus faecalis</i>              | 0 %       | 11 mm | +           |
| 5%                             |   | -         | R     |             |
| 2,5%                           |   | -         | R     |             |
| 1,25%                          |   | -         | R     |             |
| 0,625%                         |   | -         | R     |             |
| <b>Bactérie à Gram négatif</b> | <i>Escherichia coli</i>                   | 0 %       | 12 mm | +           |
|                                |   | 5%        | -     | R           |
|                                |   | 2,5%      | -     | R           |
|                                |   | 1,25%     | -     | R           |
|                                |   | 0,625%    | -     | R           |
|                                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>             | 0 %       | -     | R           |
|                                |   | 5%        | -     | R           |
|                                |   | 2,5%      | -     | R           |
|                                |   | 1,25%     | -     | R           |
| <b>Levure</b>                  | <i>Candida albicans</i>                   | 0 %       | -     | R           |
|                                |   | 5%        | -     | R           |
|                                |   | 2,5%      | -     | R           |
|                                |   | 1,25%     | -     | R           |
|                                |   | 0,625%    | -     | R           |

Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition. R: (résistant), + : (sensible), ++ : (très sensible), +++ : (extrêmement sensible). Ø: diamètre. ZI : Zone d'inhibition.

### 3.2. Interprétation et discussion des résultats

D'après nos résultats nous constatons que l'HE du *Pelargonium graveolens* est plus active sur *Staphylococcus aureus* (s) et *Streptococcus pneumoniae* avec des diamètres

d'inhibitions de 18 mm et 16 mm. Concernant les souches *Staphylococcus aureus* (R), *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli*, l'huile essentielle a exercé une faible activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibitions de 14, 11, et 12 mm, respectivement.

Pour les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*, une absence total d'activité antimicrobienne est remarqué, or aucun diamètre d'inhibition n'a été observé, ce qui montre que ces deux souches sont résistantes à l'HE de *Pelargonium graveolens* et que cette dernière ne renferme pas les molécules actives inhibant le développement de ces deux microorganismes.

Comparant ces résultats à ceux des travaux réalisé par (TEPE et al, 2005 ; GILLES et al, 2010), et qui mentionne que les bactéries Gram + sont plus sensible à l'action antimicrobienne de l'HE de cette plante que les Gram -, nous conformons cette différence de sensibilité entres les bactéries à Gram + et à Gram -. Cela est dû au fait que les Gram - possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne (CUMMINS et HARRIS, 1956).

La souche *Pseudomonas aeruginosa* s'est avérée plus résistante à notre HE. Cette résistance n'est pas surprenante. Ceci a été confirmé par plusieurs études antérieurs (HAMMER et al, 1999 ; DORMAN et DEANS, 2000).

Pour ce qui est de l'activité antifongique, HAMMER et al, (1999) ont réalisé une étude complète sur l'activité antimicrobienne de quelques HE (*Pelargonium graveolens*, *Ocimum basilicum*, *Juniperus communis*, *Eucalyptus polybractea*...) et ils en ressortent que l'essence du géranium possède un fort pouvoir inhibiteur contre *Candida albicans*. Ces résultats obtenus sont en contradiction avec les nôtres, puisque notre HE n'a montré aucune activité vis-à-vis de la souche *Candida albicans*. Nous supposons que cela est dû à la méthode utilisé qui est l'aromatogramme alors que HAMMER et al, (1999) ont utilisés la technique des dilutions en milieu gélosé ; et probablement à l'origine et le stade phénologique de la plante.

### 3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

**Tableau 11** : Les valeurs de la de la concentration inhibitrice de l'HE du *Pelargonium graveolens* vis-à-vis des germes testés.

| Concentration<br>d'HE                   | 5% | 2.5 % | 1.25% | 0.625% |
|---|----|-------|-------|--------|
| Souches                                 |    |       |       |        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (sensible) | +  | +     | -     | -      |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>         | -  | -     | -     | -      |

- : Inhibition

+ : Croissance

D'après le tableau (11), nous constatons une croissance du *Staphylococcus aureus* au contact des deux plus fortes concentrations (5% et 2.5%) d'HE du *Pelargonium graveolens*, alors qu'en revanche nous remarquons une inhibition au contact des deux plus faibles concentrations (1.25% et 0.625%), la CMI pour *Staphylococcus aureus* est de 0,625%.

Concernons *Streptococcus pneumoniae* nous constatons une inhibition au contact des 4 concentrations, ainsi la CMI pour *Streptococcus pneumoniae* est de 0.625%.

**Tableau 12** : Diamètres des zones d'inhibition (ZI) du développement des différentes souches bactérienne isolées, en fonction des différentes concentrations en HE de l'*Origanum glandulosum*.

|                                | Souches                                  | Dilutions | ZI Ø  | Sensibilité |
|--------------------------------|--|-----------|-------|-------------|
| <b>Bactérie à Gram positif</b> | <i>Staphylococcus aureus</i> (résistant) | 0 %       | 36 mm | +++         |
|                                |  | 5%        | -     | R           |
|                                |  | 2,5%      | -     | R           |
|                                |  | 1,25%     | -     | R           |
|                                |  | 0,625%    | -     | R           |
|                                | <i>Staphylococcus aureus</i> (sensible)  | 0 %       | 38 mm | +++         |
|                                |  | 5%        | 20 mm | +++         |
|                                |  | 2,5%      | 18 mm | ++          |
|                                |  | 1,25%     | 10 mm | +           |
|                                |  | 0,625%    | 21 mm | +++         |
|                                | <i>Streptococcus pneumoniae</i>          | 0 %       | 35 mm | +++         |
|                                |  | 5%        | 15 mm | ++          |
|                                |  | 2,5%      | 16 mm | ++          |
|                                |  | 1,25%     | 18 mm | ++          |
|                                |  | 0,625%    | 20 mm | +++         |
|                                | <i>Enterococcus faecalis</i>             | 0         | 30 mm | +++         |
|                                |  | 5%        | -     | R           |
| 2,5%                           |  | -         | R     |             |
| 1,25%                          |  | -         | R     |             |
| 0,625%                         |  | -         | R     |             |
| <b>Bactérie à Gram négatif</b> | <i>Escherichia coli</i>                  | 0 %       | 34 mm | +++         |
|                                |  | 5%        | -     | R           |
|                                |  | 2,5%      | -     | R           |
|                                |  | 1,25%     | -     | R           |
|                                |  | 0,625%    | -     | R           |
|                                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>            | 0 %       | 11 mm | +           |
|                                |  | 5%        | -     | R           |
|                                |  | 2,5%      | -     | R           |
|                                |  | 1,25%     | -     | R           |
|                                |  | 0,625%    | -     | R           |
| <b>Levure</b>                  | <i>Candida albicans</i>                  | 0 %       | -     | R           |
|                                |  | 5%        | -     | R           |
|                                |  | 2,5%      | -     | R           |
|                                |  | 1,25%     | -     | R           |
|                                |  | 0,625%    | -     | R           |

Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition. R : (résistant), + : (sensible), ++ : (très sensible), +++ : (extrêmement sensible). Ø : diamètre, ZI : Zone d'inhibition.

### 3.4. Interprétation et discussion des résultats

Les bactéries *Staphylococcus aureus*(R), *Staphylococcus aureus*(S), ont été très sensibles au contact de l'HE essentielle de l'*Origanum glandulosum*, avec des diamètres de 36mm et 38mm respectivement. Ces résultats sont supérieurs à ceux trouvés par DORMAN et DEANS (2000) pour l'HE d'*Origanum vulgare* qui est de 33,18 mm.

Pour *Streptococcus pneumoniae*, une forte inhibition a été constatée avec une zone d'inhibition de 35mm ainsi que des zones d'inhibitions assez importantes pour les autres dilutions qui sont de 15, 16, 18, 20mm respectivement, ce qui montre la forte activité antibactérienne des composés que contiennent cette HE vis-à-vis du *Streptococcus pneumoniae*.

D'autre part, une zone d'inhibition de 30mm a été constatée pour *Enterococcus faecalis* qui est supérieure à celle trouvée par CASSIANO et al (2007) qui est de 16.3mm, une autre zone d'inhibition pour *Escherichia coli*, qui a été très sensible vis-à-vis de l'HE de l'*Origanum glandulosum*, de 34 mm, mais seulement pour la concentration 0% (pure), pour les autres dilutions, aucune activité n'a été constatée. Cette activité inhibitrice à la concentration 100% a été supérieure à celle trouvée par DORMAN et DEANS (2000) qui est égale à 24.30mm.

*E.coli* est connue comme indispensable pour la flore intestinale, donc, l'utilisation de l'HE d'origan sous sa forme pure pourrait être un danger pour la santé de l'homme car l'utilisation des huiles essentielles sous cette forme est toxique. Nous proposons à l'avenir d'autres essais avec des concentrations inférieures à la concentration pure 0 % et supérieures à la concentration 5% étudiées pour obtenir la plus faible concentration convenable et non toxique pour l'homme.

Cependant, *Pseudomonas aeruginosa* a manifesté une très faible sensibilité à l'huile étudiée avec un diamètre de 11mm. Cette souche a été également résistante à l'action de l'huile essentielle pure d'*Origanum glandulosum* (BEKHECHI et al, 2008).

Pour la levure *Candida albicans*, aucune activité n'a été constatée, alors que PINA-VAZ et al. (2004) ont signalés que les HE d'origan provoquent une perméabilité de la membrane plasmique conduisant à la mort de la cellule fongique, ce qui est en contradiction avec nos résultats obtenus par l'HE de cette même espèce. Cette absence d'activité est due à

la période de récolte de la plante qui semble ne pas favoriser la présence des molécules à activité antifongiques.

### 3.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les résultats obtenus pour la concentration minimale inhibitrice sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau 13** : Les valeurs de la de la concentration inhibitrice de l'HE d'*Origanum glandulosum* vis-à-vis des germes testés.

| Concentration d'HE \ Souches     | 5% | 2.5 % | 1.25% | 0.625% |
|----------------------------------|----|-------|-------|--------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> (S) | -  | -     | -     | -      |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>  | -  | -     | -     | -      |

- : Inhibition

+ : Croissance

D'après le tableau 13, nous constatons une inhibition de la croissance du *Staphylococcus aureus* (S) et du *Streptococcus pneumoniae* au contact des 4 dilutions de l'HE du l'*Origanum sp* utilisées, ainsi la CMI pour nos deux bactérie est de 0.625 %.

#### 4. Evaluation de l'activité insecticide du *Pelargonium graveolens* et de l'*Origanum glandulosum*

##### 4.1.1. Identification du genre de l'insecte étudié (moustique)

D'après les résultats d'identification du genre, cette espèce appartient au genre : *Culex*

##### 4.1.2. Identification de l'espèce

D'après les résultats d'identification de l'espèce, cet insecte appartient à l'espèce: *Culex pipiens* (figure 11).

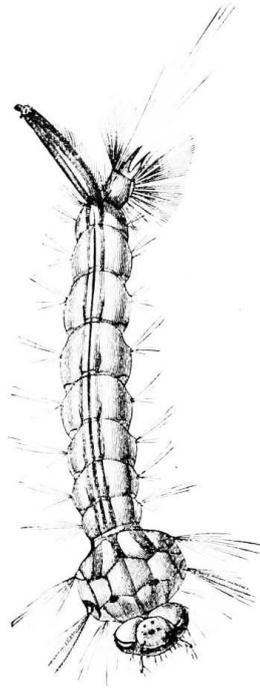


Figure 13 : Dessin d'une larve de *Culex pipiens*, photo issu du Popular Science Monthly V8 (1875).

L'espèce *Culex pipiens* est le moustique le plus abondant et le plus fréquemment récolté au niveau des différents gîtes en Algérie. En effet, d'après plusieurs auteurs : KARBOUA et MERNIZ (1997), BOUDRIHEM (2001), LOUNACI (2003), HAMAIDIA (2004), *Culex pipiens* été rencontrée dans des gîtes très divers, c'est l'espèce la plus fréquente en Algérie et en Afrique du Nord. Les larves de cette espèce sont rencontrées dans les gîtes les plus divers comme, les gîtes permanents à eau douce pauvre et riche en végétations, gîtes temporaires à eau douce riche en végétations. Cette espèce a été rencontrée par plusieurs auteurs dans les mêmes types de gîtes dont l'eau est fraîche et pure (BRUNHES et al, 1999). BERCHI (2000), affirme l'existence de cette espèce dans les milieux urbains et sub-urbains de Constantine et plus particulièrement dans les gîtes riche en matière organique.

**4.1.3. Estimation du taux de la mortalité corrigée (MC) des larves de *Culex pipiens* traités par l'HE du *Pelargonium graveolens* et de l'*Origanum glandulosum***

Les résultats de l'effet larvicide de nos deux HE essentielle sont présenté dans le (tableau 14 et Figure 12) et le (tableau 15, Figure 13).

**Tableau 14 :** Taux de mortalité corrigé des larves de *Culex pipiens* traitées à l'HE du *Pelargonium graveolens*.

| Dose HE%    |            | 24H      | 48H      |
|-------------|------------|----------|----------|
| Temps       |            |          |          |
| D1 : 5%     | R1         | 70       | 100      |
|             | R2         | 30       | 100      |
|             | Moyenne/ET | 50±28.28 | 100±0.00 |
| D2 : 2.5%   | R1         | 30       | 100      |
|             | R2         | 50       | 100      |
|             | Moyenne/ET | 40±14.14 | 100±0.00 |
| D3 : 0.625% | R1         | 40       | 100      |
|             | R2         | 40       | 100      |
|             | Moyenne/ET | 40±0     | 100±0.00 |
| Témoin      | R1         | 0        | 0        |

R : Répétition.

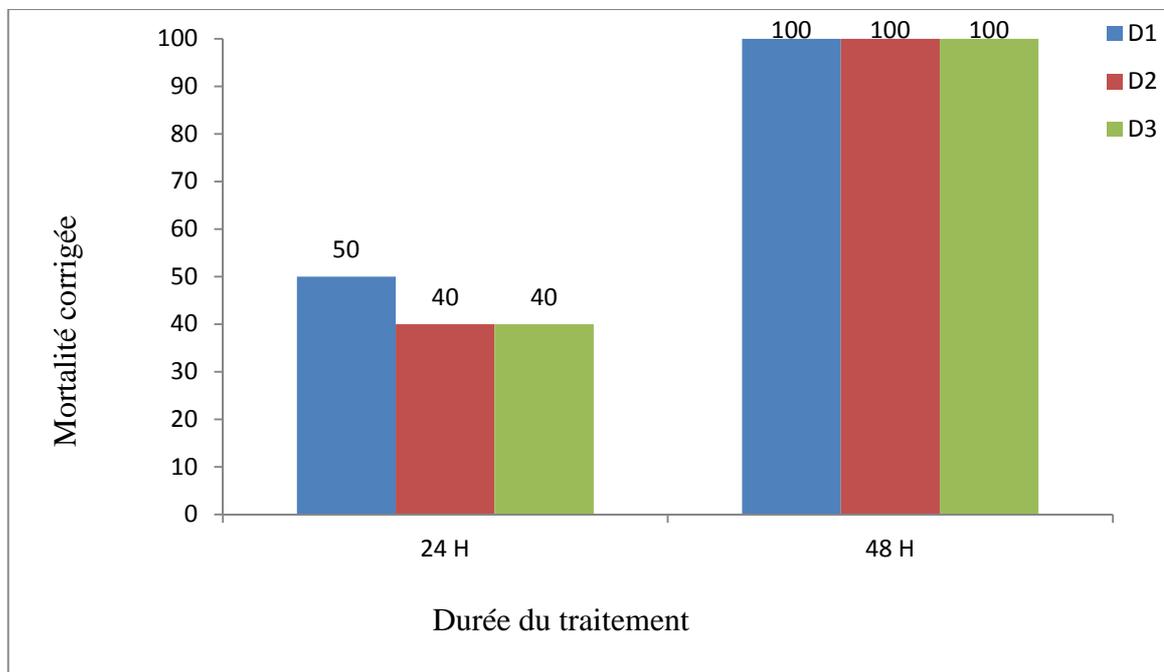


Figure 14 : Représentation graphique du pourcentage de mortalité des larves du *Culex pipiens* exposées à l'HE du *Pelargonium graveolens*.

**Tableau 15** : Taux de mortalité corrigé des larves de *Culex pipiens* traitées à l’HE de l’*Origanum glandulosum*.

| Dose HE%    |            | Temps |  | 24H      | 48H      |
|-------------|------------|-------|--|----------|----------|
| D1 : 5%     | R1         |       |  | 80       | 100      |
|             | R2         |       |  | 60       | 100      |
|             | Moyenne/ET |       |  | 70±14.14 | 100±0.00 |
| D2 : 2.5%   | R1         |       |  | 90       | 100      |
|             | R2         |       |  | 40       | 100      |
|             | Moyenne/ET |       |  | 65±35.35 | 100±0.00 |
| D3 : 0.625% | R1         |       |  | 50       | 100      |
|             | R2         |       |  | 50       | 100      |
|             | Moyenne/ET |       |  | 50±0     | 100±0.00 |
| Témoin      | R1         |       |  | 0        | 0        |

R : Répétition

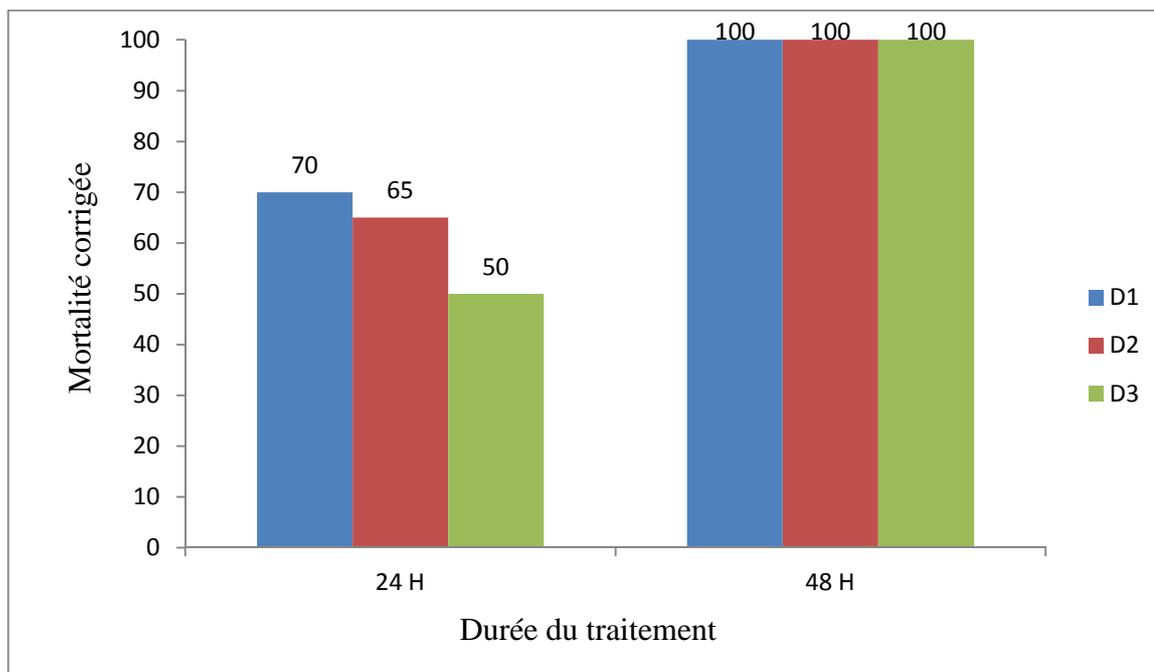


Figure 15 : Représentation graphique du pourcentage de la mortalité des larves du *Culex pipiens* exposées à l’HE de l’*Origanum glandulosum*.

#### 4.1.4. Interprétation et discussion

D’après le (tableau 14 et Figure 12) et le (tableau 15, Figure 13), nous remarquons que pour les deux HE, le taux de mortalité est plus important pour la concentration élevée d’HE (5%) avec 50% de mortalité pour le *Pelargonium graveolens* et 70% de mortalité pour l’*Origanum glandulosum*. Cette mortalité est plus faible avec les deux concentrations (2.5%) et (0.625%), mais, ils ont données des résultats de mortalité assez considérables avec un taux

qui varie entre (50 à 65%) pour *l'Origanum glandulosum* et 40% pour le *Pelargonium graveolens*.

Nous constatons aussi que *l'Origanum glandulosum* a été légèrement plus efficace que le *Pelargonium graveolens* alors que le *Pelargonium graveolens* est bien plus connu dans la littérature en tant que répulsif de moustique. Ces résultats nous démontrent que l'effet larvicide d'un produit n'est pas comparable à l'effet répulsif.

Nous constatons aussi que pour nos deux HE essentielles le taux de mortalité est à 100% dès le deuxième jour, ce qui signifie que la mortalité des larves évolue dans le temps pour les trois doses.

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques et ces activités sont liées essentiellement à la composition chimique et aux groupes fonctionnels (VAGI et SIMANDI, 2005) et il a été déjà prouvé que, les différentes réponses sont en fonction à la fois du type d'huile et sa concentration (OLIVEIRA et al, 2010).

#### 4.1.5. Analyse statistique

Le logiciel utilisé est le : SYSTAT VERSION 7.0, COPYRIGHT (C) 1997, SPSS INC.

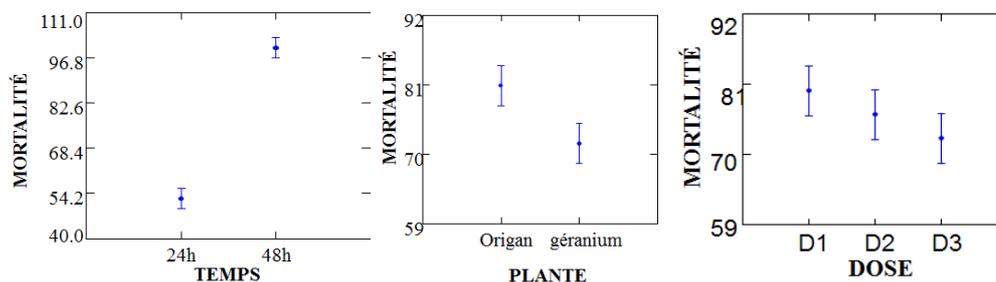


Figure 16 : Activité larvicide des huiles essentielles du *Pelargonium graveolens* et de *l'Origanum glandulosum* en model GLM.

L'analyse de la variance montre que le temps a un effet hautement significatif ( $p=0,000$ ) sur l'activité larvicide des huiles essentielles des deux plantes utilisées. Les deux huiles essentielles ont un effet larvicide mais avec une différence non significative ( $p=0,263$ ). Par contre l'effet dose a un effet très significatif sur l'activité larvicide ( $p=0,001$ ) des deux huiles essentielles. (Figure 14).

**4.1.6. Calcule des doses létales (DL50) du *Pelargonium graveolens* et de l'*Origanum glandulosum***

La dose létale qui tue 50% de la population d'un ravageur (DL50), est estimée par établissement de la droite de régression des probits des taux de mortalités donnés par la table de Finney (1952), en fonction du logarithme des doses.

La DL50 renseigne sur l'importance de l'effet des huiles essentielles des deux plantes testées sur les larves de moustique dans le temps.

**Tableau 16 :** Logarithmes décimaux des doses et les probits des taux de mortalité.

|        |       | <i>Pelargonium graveolens</i> |      |        |       | <i>Origanum glandulosum</i> |      |
|--------|-------|-------------------------------|------|--------|-------|-----------------------------|------|
|        |       | 24h                           | 48h  |        |       | 24h                         | 48h  |
| Log D1 | 1.699 | 5                             | 8.09 | Log D1 | 1.699 | 5.52                        | 8.09 |
| Log D2 | 1.398 | 4.75                          | 8.09 | Log D2 | 1.398 | 5.39                        | 8.09 |
| Log D3 | 0.796 | 7.75                          | 8.09 | Log D3 | 0.796 | 5                           | 8.09 |

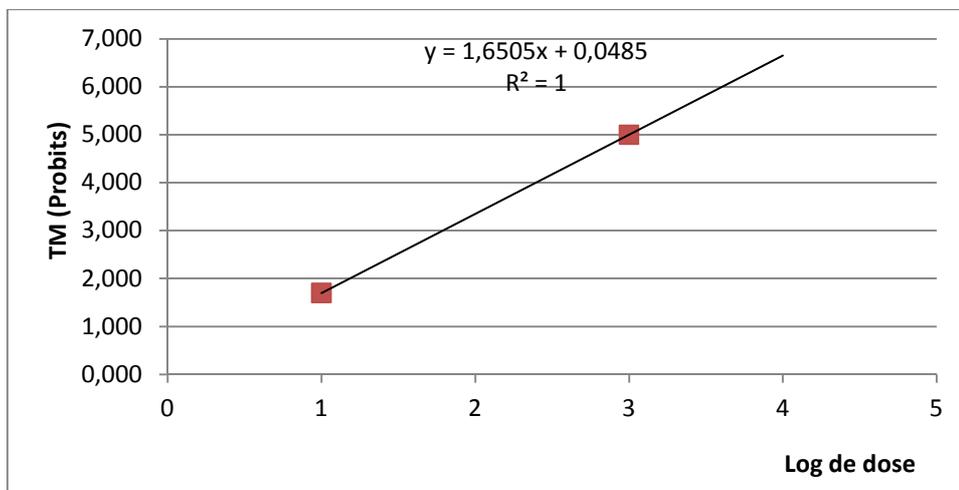


Figure 17 : DL 50 chez les larves de *Culex pipiens* 24h après traitement à l'huile essentielle du *Pelargonium graveolens*.

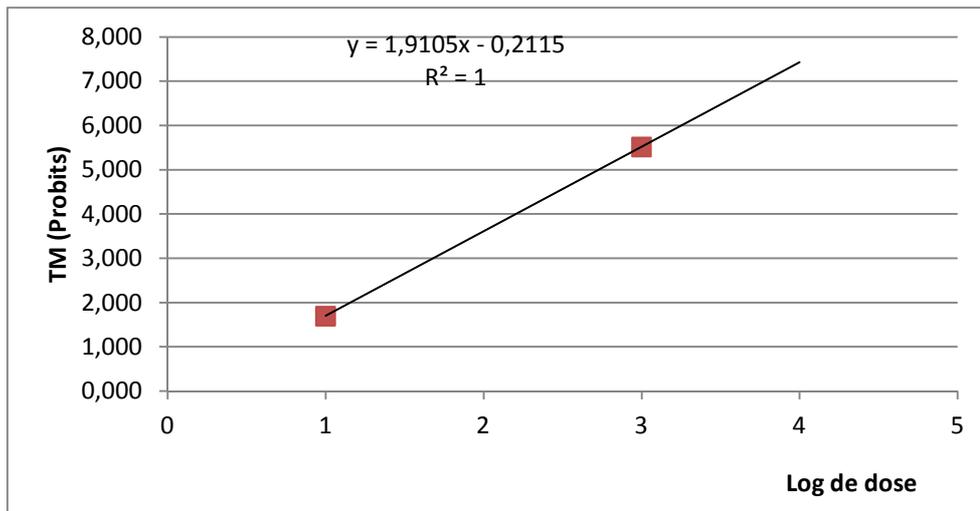


Figure 18 : DL 50 chez les larves de *Culex pipiens* 24h après traitement à l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*

Nous avons constaté que la dose en pourcentage d'HE nécessaire pour tuer 50% de la population larvaire de moustique est de 1.995% pour l'HE du *Pelargonium graveolens* et de 1.870% pour l'HE d'*Origanum glandulosum*.

Concernant la DL 90, la dose en pourcentage d'HE nécessaire pour tuer 90% de la population larvaire de moustique est de 2.382% pour l'HE du *Pelargonium graveolens* et de 2.182% pour l'HE d'*Origanum glandulosum*.

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que l'HE d'*Origanum glandulosum* est légèrement plus efficace que l'HE du *Pelargonium graveolens*, que ce soit pour la DL 50 ou DL 90, toutefois l'effet larvicide de nos deux HE est assez proche et peuvent être considérés comme des bon larvicides.

Notre travail à été mené afin d'évalué l'effet antimicrobien et larvicide de deux huiles essentielles (*Pelargonium graveolens* et *Origanum glandulosum*).

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation pour nos deux plantes, on utilisant seulement les feuilles pour une durée de 2h30 pour chaque extraction.

L'effet antibactérien a été réalisé on adoptant la technique de l'aromatogramme, d'où on a constaté que l'HE du *Pelargonium graveolens* a donnée quelques résultats significatifs, en inhibant la croissance du *Staphylococcus aureus* (s) et du *Streptococcus pneumoniae* a des diamètres d'inhibitions de 18 mm et 16 mm respectivement, avec une CMI de 0.625% pour ces deux souches, toutefois nous avons réalisé que pour l'HE de l'*Origanum glandulosum*, les résultats de l'activité antimicrobienne ont été bien plus importants, en obtenant les zones d'inhibitions suivantes : 36 mm pour *Staphylococcus aureus* (R), 38 mm pour *Staphylococcus aureus* (s) , 35 mm pour *Streptococcus pneumoniae* et de 34 mm pour *Escherichia coli*, avec une CMI de 0.625 pour les souches *Staphylococcus aureus* (S) et *Streptococcus pneumoniae*.

Ainsi l'HE essentielle de l'*Origanum glandulosum* a été plus efficace sur les souches bactériennes utilisées que l'HE du *Pelargonium graveolens*.

L'effet larvicide de nos deux huiles essentielles a été porté sur les larves de moustique de l'espèce *Culex pipiens*, tout comme l'effet antimicrobien nous avons constaté que l'HE de l'*Origanum glandulosum* a été légèrement plus efficace que le *Pelargonium graveolens*, avec un taux de mortalité moyenne de 70% contre 50 % pour le *Pelargonium graveolens* à une concentration d'HE de 5%, pour la concentration de 2.5% nous avons trouvé un taux de mortalité de 65% pour l'*Origanum glandulosum* et 40% pour le *Pelargonium graveolens*, et pour la dernière concentration qui est de 0.625% nous avons trouvé un taux de 50% pour l'*Origanum glandulosum* et de 40% pour le *Pelargonium graveolens*.

Nos deux HE essentielles ont montré un taux de mortalité de 100% après 48h pour toutes les concentrations utilisées, ce qui prouve que les HE de l'*Origanum glandulosum* et du *Pelargonium graveolens* ont été efficace contre les larves du *Culex pipiens*.

L'analyse de la variance de l'activité larvicide de nos deux HE par le test GLM, nous a permis d'affirmé que le temps a un effet hautement significatif ( $p=0,000$ ) et la dose des HE très significatif ( $p=0,001$  sur les larves de moustiques).

La DL50 et DL90 pour l'HE du *Pelargonium graveolens* été de (DL50 =1.995%), (DL90 =2.382%), et pour l'HE de l'*Origanum glandulosum* (DL50 =1.870%), (DL90 =2.182%), d'après ces résultats nous avons constaté que l'effet larvicide de nos deux HE est assez proche et peuvent être considérés comme des bon larvicides.

Comme perspective il serait intéressant :

- D'évaluer l'activité antimicrobienne de nos deux HE sur une gamme élargie de souches microbiennes, tout employant d'autres méthodes comme la technique des micropuits et la dilution au milieu gélosé, ainsi que la détermination de la CMB.

- Etudier d'autre activité de nos deux HE telles que l'activité anti-inflammatoire, anti-oxydante, antidiabétique.

- Il serait tout aussi intéressant de tester l'efficacité de nos deux HE dans les gîtes naturels en tant qu'insecticide biologique sur les œufs, les larves et les adultes de *Culex pipiens* afin de vérifier leurs utilisations à large échelle.

1. **ABDULLAH IJAZ H**, 2009. Characterisation and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae 218p.
2. **ABEKELE J. et HASSANALI**, 2001. Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of *Ocimum kilimandscharicum* and *Ocimum kenyense* (Labiatae) on two post-harvest insect pests. *Phytochemistry*, p 385 - 391.
3. **ADREO S**, 2003. L'effet anti-gorgement sur chien d'un shampooing à 0,07% de deltaméthrine sur un moustique du complexe *Culex pipiens*. Th : Med. Vet : Toulouse ; p 128. 63.
4. **AFNOR. (2000)**. Recueil de normes : Les huiles essentielles. Tomes 2. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, Paris, pp : 661-663.
5. **AIT ABDELOUHAB N**, 2001. Microbiologie alimentaire, Université de Constantine, Alger, p22-23.
6. **ALLOU F et NADJARI F**, 2002. Etude des bactéries causant la GEI, Institut de biologie de Blida, p47.
7. **ANTON R. et LOBSTEIN A**, 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 522p.
8. **AOUINTY B. OUFRAS. MELLOUKI F. Et MAHARI S**, 2006. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10(2), 67-71.
9. **ARCHAMBAUD M, CLAVE D**, 2007. Fiche technique : *E. faecalis*, Laboratoire de Bactériologie Hygiène, CHU Toulouse Rangueil.
10. **AVRIL F, AVRIL J-L, DABERNAT H, FRANÇOIS D, MONTEIL H**, 2002. *Bactériologie clinique*, 2ème édition, 511p.
11. **BAKHECHI. C, ATIK-BEKKARA. F et ABDELOUAHID. D.E** ; 2008. Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie, pp : 153-159.
12. **BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D. et IDAOMAR M**, 2008. Biological effects of essential oils. *Food and chemical toxicology*. 46, pp : 446-475.
13. **BASTIEN F**, 2008. Effet larvicide des huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* à la réunion. Thèse de Doctorat, univ de Toulouse, p52.
14. **BENDAHOU. M, MUSELLI A, GRIGNON-DUBOIS. M, BENYOUCEF. M, DESJOBBER, et BERNARDINI A.F**, 2008. Antimicrobial activity and chemical composition

of *Origanum glandulosum* desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction, comparison with hydrodistillation food Chemistry p106, 132-139.

15. **BENJILALI B, TANTAOUI-ELARAKI A, ISMAILI-ALOUÏ M, AYADI A**, 1986. Méthode d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plante médicinale phytothérapie, pp : 155-167.
16. **BERCHI S.**, 2000. Bioécologie de *Culex pipiens L. (Diptera : Culicidae)* dans la région de Constantine et perspectives de luttés. Thèse de Doctorat, option Entomologie. Université de Constantine, Algérie 133p.
17. **BILLERBECK V.G**, 2007. Huiles essentielles et bactérie résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5, pp : 248-251.
18. **BILLERBECK V.G**. 2002. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles ; *Hygiènes*, pp : 248-251.
19. **BOUDRIHEM R.**, 2001. Contribution à l'étude d'un inventaire systématique des *Culicidae (Diptera, Nematocera)* dans quelques gîtes situés dans la région de Touggourt. Mém de DES. Univ de Constantine, 20p.
20. **BOUKHATEM MN, HAMAÏDI MS, SAÏDI F, HAKIM Y**, 2010. Extraction, composition et propriétés physico chimiques de l'huile essentielle du géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) cultivée dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature et Technologies*, 03, pp : 37-45.
21. **BOUKHATEM MN, KAMELI A, SAÏDI F, HAMAÏDI MS, MEKARNIA M**, 2012. Parfum de crise sur géranium Algérien. Séminaire National sur les plantes Aromatiques et Médicinales, Khemis-miliana. Algérie.
22. **BOURGEOIS B**, 2007. « Le grand livre des plantes aromatiques », Edition Rustica, (2007), p 134.
23. **BOYLE W**, 1955. Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfumer ESSENT. Oil Rev.* 66, pp : 25-28.
24. **BRUNETON J**, 1999. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 3<sup>e</sup> Ed : Lavoisier ; Paris, 1120p.
25. **BRUNHES J., RHAÏM A., GEOFFROY B., ANGEL G. et Hervy J.P**, 1999. Les *Culicidae* d'Afrique méditerranéenne. Logiciel de l'institut de recherche pour le développement (I.R.D), Montpellier, ISBN 2-7099-1446-8.
26. **BURT S.A**, 2004. Des huiles essentielles, leurs propriétés antibactériennes et application dans les aliments, *J. inter. De Microbiologie des Aliments*, 94, pp : 223-253.

27. **BUSSIERAS J., CHERMETTE R**, 1991. Parasitologie Vétérinaire, Entomologie, *Service de Parasitologie, ENVA*, p 58-61.
28. **BYRNE KI., NICHOLS R.A**, 1999. *Culex pipiens* in London underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations. *Heredity* 82: 7-15.
29. **CANDACE A., SOUSA, RICHARD E.W. HALLIWEL**, 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XI) : the relationship between arthropod hypersensitivity and atopic dermatitis in the dog, *Veterinary immunology and immunopathology*, 81,233-2327.
30. **CASSIANO. B, ALTEMIR. J-M, MARIA. R, ALVES R; ROGERIO, L-C; JOSE. V;** 2007. Evaluation of *origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage Brazilian, *journal of microbiology* 616p.
31. **CAVELIER P**, 1962. Les campagnes expérimentales d'éradication du paludisme dans le nord de la République du Cameroun. Les vecteurs et l'épidémiologie du paludisme dans le Nord-Cameroun. *Méd. Trop.*, 21 : 847-870.
32. **CIMMINS CS, HARRIS H**, 1956. The chemical composition of the cell wall in some grame-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *Journal of General Microbiology*, 14(3), pp: 583-600.
33. **COWAN M**, 1999. Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiologie Reviews*, p12, 564-582.
34. **CRISTIANI M., D'ARRIGO M., MANDALARI G., CASTELLI F., SARPIETRO M.G. et MICIELI D**, 2007. interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes : implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 55, pp : 6300-6308.
35. **CROTEAU R., KUTCHAN T.M. et LEWIS N.G**, 2000. Natural products (secondary metabolites). *American society of Plant Physiologists*, pp : 1250-1268
36. **DAPKEVICIUS A., VENSKUTONIS R., VABEEK T.A. et LINSSEN J.P.H**, 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. of Science food and agriculture*. 77, pp : 140-146.
37. **DARRIET F**, 1998. La lutte contre les moustiques nuisant et vecteurs de maladie l'évaluation de nouveaux insecticides utilisables contre les moustiques en Afrique tropicale Ed. Paris p11, 18, 19, 26.
38. **DEMARNE FE**, 1985. Le géranium rosat. *Parfums, Cosmétiques et Arômes*, n°62.
39. **DEMARNE FE**, 1986. La sélection des pélargoniums à parfum. *J.I.H.E, Digne Vol* 39.

40. **DEMARNE FE**, 1989. L'amélioration variétale de géranium rosat : contribution systémique caryologique et biochimique. ORSQY(France) ; université de Paris-Sud, pp : 180-250.
41. **DORMAN H.J.D. et DEANS S.G**, 2000. Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *J.Appl. Microbiol.* 88, 99 : 308-316.
42. **Encyclopédie des plantes médicinales**, 1996. Edition Larousse, p 242.
43. **FARAJ C., ELKOHILI M., LYAGOUBI M.**, 2006. Cycle gonotrophique de *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae), vecteur potentiel du virus West Nile, au maroc : estimation de la durée en laboratoire. *Bull. Soc. Path. Exot.* 99 (2) : 119-121
44. **FIGUEREDO G**, 2007. « Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne », thèse doctorat, université Blaise Pascal, France, p47.
45. **FISHER K. et PHILLIPS C**, 2009. Potentiel antimicrobien des huiles essentielles dans les aliments. *Trends in food science and Technology*, 19, pp : 156-164.
46. **FROUHAT Z et LAHCINI B**, (2013). Lutte biologique par la huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*. Thèse Master. Biochimie. Université Kasdi Merbah . Ouargla, pp14-16.
47. **GABRIEL L. HAMER, URIEL D. KITRON, JEFFREY D. BRAUN, SCOTT R. LOSS, MARRILYN O. RUIZ, TONY L. GOLDBERG, and EDWARD D. Walker**, 2008. *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): A Bridge Vector of West Nile Virus to Humans. *Journal of Medical Entomology* p : 125-128.
48. **GARNERO J**, 1977. L'évolution des méthodes et techniques d'analyse dans l'étude de la composition chimique des huiles essentielles. *Labo-pharma Problèmes et techniques*, 277p.
49. **GARNIER. S, SOUCILLE EPOUSE FORT**, 1961: Contribution à l'étude comparative des origans (Sensu Labiatae) et leurs huiles essentielles, thèse de doctorat.
50. **GILLES M, ZHAO J, AN M, AGBOOLA S**, 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food chemistry*, 119(2), pp: 731-737.
51. **GOMES PB, MATA VG, RODRIGUES AE**, 2004. « Characterization of Portuguese grown geranium oil (*Pelargonium* sp.) ». *J. Essent. Oil Res.* 16 pp: 490-495.
52. **GUILLOMOT L**, 2005. Les moustiques et la dengue. Article, *Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie*, 15p.
53. **GUYATT H.L., DNOW R.W. & EVANS D.B.**, 1991. Malaria epidemiology and economic effects of delayed immune acquisition on the cost effectiveness of insecticide treated bed nets. *Tans. R. Soc. Lon. B.* 345: 827-835.

54. **HAMAIDIA H.**, 2004. Inventaire et biodiversité des *Culicidae* (*Diptera*, *Nematocera*) dans la région de Souk-Ahras et de Tebessa (Algérie). Mem Mag. Univ de Constantine, 152p.
55. **HAMMER KA, CARSON CF, RILEY TV**, 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), pp: 985-990.
56. **HARBACH R**, 2008. Family Culicidae Meigen, 1818. Mosquito Taxonomic Inventory pp: 591–688.
57. **HASSAINE K.**, 2002. Bioécologie et biotypologie des Culicidae de l’Afrique méditerranéenne. Biologie des espèces les plus vulnérantes (*Ae. Caspius*, *Ae. detritus*, *Ae. Mariae* et *C. pipiens*) dans la région occidentale algérienne. Thèse de doctorat. Université de Telemcen.
58. **HAXHE J, M ZUMOFEB**, 1999. Notion d’hygiène hospitalière, faculté de médecine, université catholique de Louvain.
59. **HEGH E.**, 1921. Les moustiques, mœurs et moyens de destruction. Ed. Imprim. Indust. & Financ., Bruxelles, 239p.
60. **HEMWIMON S. ; PAVASANT P. et SHOTIPRUX A.** (2007) – Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and purification technology*, 54, 99 pp : 44-50.
61. **HMAMOUCHE M**, 1997. « Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaire, médicinales et toxiques au Maroc », édition Ciheam, p 94.
62. **HOSTETTMANN K**, 1997. Tout savoir sur le pouvoir des plantes, source de médicaments. Ed. Fabre S A, Lausanne, Suisse, 235 p.
63. **HUBALEK Z. & HALOUZKA J.**, 1999. West Nile fever a reemerging mosquito borne viral disease in Europe. *Emerg infect Dis*. 5: 643-650.
64. **IETSWAART J. H.**, 1980. A Taxonomie Revision of the Genus *Origanum* (Labiatae). Leiden University Press p36.
65. **ILM**, 2014. <http://www.ilm.pf/infomoustiques> .
66. **ISMAN**, 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19 (2000) p 603-608.
67. **KALEMBA D. et KUNICKA A**, 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, pp : 813-829.
68. **KERBOUA F., MERNIZ N.**, 1997. Contribution à l’impact de quelques paramètres physico-chimiques des eaux, sur la prolifération des *Culicidae* (*Diptera*) en zone prèurbaine

- (Wilaya de Constantine). Cas particulier de *Culex pipiens L.* Mém dlng d'état en écologie, Univ. De Constantine, 72p.
- 69. KETTLE D.S.**, 1995. Medical and Veterinary Entomology, 2<sup>o</sup> edition, Wallingford: CAB international, 725p.
- 70. KIM N.S. et LEE D.S.**, 2002. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 98, pp : 31-47.
- 71. KLEIN P.H.**, 1995. Microbiologie de boeck université, Bruxelles, p433-453.
- 72. KOBÁ K., SANDA K., RAYNAUD C., NENONENE Y.A., MILLET J. et CHAUMONT J.P.**, 2004. Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon sp.* Vis-à-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de médecine Vétérinaire*, 148, pp : 202-206.
- 73. LACOSTE S.**, 2010. « L'origan un super anti-infectieux naturel », édition Talantikit, p16, 17.
- 74. LANE R. P., CROSSKEY R.W.**, 1993. *Medical Insects and Arachnids*. Chapman & Hall, London, 723p.
- 75. LARPENT J.P.**, 1990. *Escherichia coli* 0157 : h7, Tes et Doc, p3.
- 76. LECLERC H, GAILLARD J-L, SIMONET M.**, 1995. Microbiologie générale, la bacteria et le monde bactérien, doin éditeur, Paris.
- 77. LEGRAND G.**, 1993. Manuel de préparateur en pharmacie. Masson, Paris.
- 78. LIS-BALCHIN M.**, 2002. Lavender: the genus *Lavandula*. Taylor and Francis, London, pp : 155-200.
- 79. LOUNACI Z.**, 2003. Biosystématique et bioécologie des *Culicidae (Diptera, Nematocera)* en milieux rural et agricole. Thèse Mag. INA, El-harrach, 150p.
- 80. LUCCHESI M.E.**, 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en science, discipline : Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Science et Technologies.
- 81. MAHMOUDI Y.**, 2011. La thérapeutique par les plantes en Algérie Editions: Palais du livre-Blida, 27p.
- 82. MANN J.**, 1987. Secondary metabolism. *Clarendon Press*, Oxford, 374p.
- 83. MAY J., CHAN C.H., KING A., WILLIAMS L. et FRENCH G.L.**, 2000. Time kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother*, 45, pp : 639-643.

- 84. MEBARKI N**, 2010. Extraction de l'huile essentiel de *thymus fontanesi* application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Thèse magister. Université de Boumerdes, 124p.
- 85. MOHAMMEDI Z**, 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magister. Option : Produits naturels, activité biologique et synthèse. Faculté des sciences. Université ABB. Tlemcen Algérie.
- 86. MOHAN D. et RAMASWAMY M.**, 2007. Evaluation of larvicidal activity of the leaf extract of a weed plant, *Ageratina adenophora*, against two important species of mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. African journal of biotechnology Vol.6, p 631-638.
- 87. NTONIFOR NN. Et al.**, 2006. Traditional use of indigenous mosquito-repellents to protect humans against mosquitoes and other insect bites in a rural community of Cameroon. *East Afr Med J.* p 83.
- 88. NYABYENDA, P**, 2007. Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique : Cultures industrielle et d'exploitation, cultures fruitières, cultures maraîchère (Vol. 2). Presses Agronomiques de Gembloux (Belgique), 120p.
- 89. OLIVEIRA P V., FERREIRA JR. FABYANNE S. MOURA & GERSON S. LIMA & FERNANDO M. DE OLIVEIRIA & PARICIA EMANUELLA S. OLIVEIRA & LUCIA M. CONSERVA & ANA MARIA GIULIETTI & ROSANGELA P. LYRA LEMOS.**, 2010. Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes Aegypti L. (Diptera : Culicidae)* Parasitol Res 107:403-407.
- 90. OMS**, 1999. La lute antivectorielle. Méthodes à usage individuel et communautaire – Genève.
- 91. OURAINI D., AGOUMIL A., ISMAILI-ALAOUI M., ALAOUI L., CHERRAH Y., AMRANI M. et BELLABAS M.A**, 2005. Etude l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, 4, pp : 147-157.
- 92. OUSSOU K.R., COFFI K., NATHALIE G., SERIYOLOU, GERARD K., MIREILLE D., YAO T.N., GILLES F. et JEAN-CLAUDE C.H**, 2004. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes rendus de Chimie*, 7, pp : 1081-1086.
- 93. PAPIRIEROK B., CROSET H., RIOUX J.A.**, 1975. Estimation de l'effectif des populations larvaires d'*Aedes Cataphyla dyar* 1916 (*Diptera, Culicidae*). Méthode utilisant

- le « COUD de louche » ou «(Dipping) cah. O.R.S.T.O.M., Ent. Méd. et Parasitol., vol. XII no 1 p : 47-51.
- 94. PAULI, A.** 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather.* 11, 126-133.
- 95. PIBIRI M.C,** 2005. assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale, EPFL. Lausanne (Suisse). 161p.
- 96. PINA V, RODRIGUES A. G, PINTO. E, COSTA-DE-OLIVEIRA. S, TAVARES. C, SALGUEIRO. L.R, CAVALEIRO. C, GONCALVES.M. J, MARTINEZ-DE-OLIVEIRA. J;** 2004. Antifungal activity of thymus oils and their major compounds.
- 97. PITMAN V,** 2004. Aromatherapy: A practical approach. Nelson Thomas éd, New-York, pp : 236-238.
- 98. PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C. et ROURA S.I.,** 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. 36, pp : 679-684.
- 99. RAJESWARA RAO BR.,**2002 «Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacings and intercropping with cornmint (*Mentha arvensis* L.f. *piperascens* Malinv. ex Holmes) ». *Industrial Crops and Products* pp: 133–144.
- 100. RAMADE, F** ,2007. Introduction à l'écotoxicologie : fondement et application. Ed. Tec et Doc, 618p.
- 101. RAOULT D,** 1999. Charaterization of mutations in the RPOB gene in naturally rifampin-resistant Rickettsia species. *Antimicrob. Agent Chemother.*
- 102. RIOUX J-A.,** 1958. Les Culicidae du « Midi » méditerranéen. Etude systématique et écologique, Ed. Paul le chevalier, Paris : 301p.
- 103. RODHAIN F. et PEREZ C.,** 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Ed. Maloine S. A., Paris, 458p.
- 104. RODOLFO-JULIANI H, KOROCH A, SIMON JE, HITIMANA N,** 2006. Quality of geranium oils (*Pelargonium* Species) : Case studies in Southern and Eastern Africa. *Journal of Essential Oil Research*, 18, pp/ 116-121 (Special Edition 2006).
- 105. ROUBAUD E.,** 1933. Essai synthétique sur la vie du moustique commun *Culex pipiens*. *Ann. Sc. Nat. Zoologique*, 163p.

- 106. SATRANI B, FOUGRASH H, BOURKHISS B, BOUSTA D, TALBI M, 2007.** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'HE de *Cladanthus mixtus*. Bulletin de la société de Pharmacie de Bordeaux, 146, pp : 85-96.
- 107. SAVAGE H.M. & MILLER B., 1995.** House Mosquitoes of the U.S.A., *Culex pipiens* Complex. Wing Beats 6: 8-9.
- 108. SAYOUS, D-J. et CHEVALLIER, J, 2009.** « La cosmétique bio », éditions Eyrolles, p87.
- 109. SCHUHMACHER A. et REICHLING P, 2003.** Virucidal effect of Peppermint oil on the enveloped viruses Herpes Simplex Virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine*, 10, pp : 504-510.
- 110. STEP E, 1897.** Favourite flowers of garden and greenhouse, Vol 1, p116.
- 111. TAPONDJOU A.L ; TENDONKENG F, 2003.** Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Acanthoscelides obtectyus* (Say) (Coleoptera; Bruchidea) TROPICULTURA, 27, 3, 137-143.
- 112. TEIXEIRA-DUARTE M.C., MARA FIGUEIRA G. & SARTORATTO A, 2005.** Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, pp : 305-311.
- 113. TEPE B, DAFERERA D , SOKMEN M, SOKMEN A, POLISSIOU M, 2005.** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller. (Lamiaceae). Food Chemistry, 90, pp: 333-340.
- 114. TOHIDPOUR A., SATTARI M., OMIDBAIGI R., YADEGAR A. et NAZEMI J, 2010.** Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *phytomedicine*. 17, pp : 142-145.
- 115. URQUHART G. M., ARMOUR J., DUNCAN J.L., DUNN A.M., JENNINGS F.W., 1996.** Veterinary parasitology. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford : Blackwell science., 307p
- 116. VINOGRADOVA EB., 2003.** Ecophysiological and morphological variations in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex (Diptera : Culicidae). Acta Soc Zool Bohem 67:41-50.
- 117. WEILL M., DURON O., LABBE P., BERTHOMIEU A., RAYMOND M., 2003.** La résistance du moustique *Culex pipiens* aux insecticides. M/S 12 (19).
- 118. ZAIKA L, 1988.** Spices and herbs : their antibacterial activity and its determination. Journal of food safety, 9, pp : 97-118.
- 119. ZHIRI A. (2006).** Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News. Science, Nutrition, Prévention et santé. Edité par la Fondation pour le libre choix, 12, 8.

- 120. ZIENTARA S., DUFOUR B., MOUTOU F., GUITTENY B., 2001.** Le point sur l'épizzotie française de West-Nile en 2000. *Bulletin épidémiologique de l'Afssa* no 1 : 1-2.

## ANNEXE 01

**Tableau I** : Matériel de laboratoire et appareillage.

| Appareillage   | La verrerie et autres   | Réactifs et solvants  |
|--|---|---|
| Balance de précision.<br>Etuve.<br>Hotte.<br>Autoclave.<br>Chauffe ballon.<br>Hydrodistillateur.<br>Bec bunsen.<br>Microscope Photonique.<br>Frigidaire. | Erlenmeyer.<br>Eppendorf.<br>Eprouvette.<br>Béchers.<br>Ballon.<br>Pipette gradué.<br>Pipette pasteur.<br>Micropipette.<br>Boites de pétri.<br>Eprouvette graduées.<br>Tubes à essai.<br>Ampoule à décanter.<br>Disques d'antibiotiques.<br>Ecouvillon.<br>Entonnoir.<br>Pince.<br>- Milieu de culture :<br>Milieu Mueller Hinton.<br>Milieu Sabouraud. | Eau distillée.<br>Eau physiologique.<br>Eau de Javel.<br>Ethanol 70°.<br>Tween 20.<br>Hydroxyde de potassium<br>(KOH).<br>Acide chlorhydrique (HCL).<br>Phénophtaléine. |

## ANNEXE 02

**Tableau II** : Analyse de la variance de l'activité larvicide des huiles essentielles par le test GLM.

| Analysis of Variance : test GLM |                |    |             |    |       |
|---------------------------------|----------------|----|-------------|----|-------|
| Source                          | Sum-of-Squares | df | Mean-Square | F- | P     |
| <b>ratio</b>                    |                |    |             |    |       |
| TEMP                            | 5801.786       | 1  | 5801.786    |    | 0.000 |
| 33.394                          |                |    |             |    |       |
| PLANTE                          | 252.083        | 1  | 252.083     |    | 0.263 |
| 1.451                           |                |    |             |    |       |
| DOSE                            | 10079.464      | 3  | 3359.821    |    | 0.001 |
| 19.339                          |                |    |             |    |       |
| Error                           | 1389.881       | 8  | 173.735     |    |       |

## ANNEXE 03

Tableau III : Les 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 | 4,18 | 4,5  | 4,53 | 4,56 | 4,59 | 4,61 | 4,64 | 4,67 | 4,69 | 4,72 |
| 40 | 4,75 | 4,77 | 4,8  | 4,82 | 4,85 | 4,87 | 4,9  | 4,92 | 4,95 | 4,97 |
| 50 | 5    | 5,03 | 5,05 | 5,08 | 5,1  | 5,13 | 5,15 | 5,18 | 5,2  | 5,23 |
| 60 | 5,25 | 5,28 | 5,31 | 5,33 | 5,36 | 5,39 | 5,41 | 5,44 | 5,47 | 5,5  |
| 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    | 0,1  | 0,2  | 0,3  | 0,4  | 0,5  | 0,6  | 0,7  | 0,8  | 0,9  |
| 99 | 7,33 | 7,37 | 7,41 | 7,46 | 5,51 | 7,58 | 7,65 | 7,75 | 7,88 | 8,09 |

## 1. Généralités sur les plantes étudiées

### 1.1. Géranium rosat

#### 1.1.1. Histoire

Les nombreuses espèces spontanées d'Afrique du Sud furent introduites en Europe vers le XV<sup>ème</sup> siècle à une époque où tout bon voyageur se rendant au pays des épices et de parfums passait par le cap de Bonne Espérance.

**Tableau 1** : Position systématique du *Pelargonium graveolens* (DEMARNE et al., 1989).

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Domaine</b>            | Eukaryota                                     |
| <b>Règne</b>              | Plantae                                       |
| <b>Sous-règne</b>         | Tracheobionta                                 |
| <b>Embranchement</b>      | Spermatophyta                                 |
| <b>Sous-embranchement</b> | Magnoliophyta                                 |
| <b>Classe</b>             | Magnoliopsida                                 |
| <b>Sous-classe</b>        | Dialypétales                                  |
| <b>Ordre</b>              | Geraniales                                    |
| <b>Famille</b>            | Geraniaceae                                   |
| <b>Genre</b>              | <i>Pelargonium</i>                            |
| <b>Espèce</b>             | <i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér.Ex Aiton. |

Le géranium rosat, comme plante aromatique, ne fut pas connu du monde méditerranéen. Pourtant à Constantinople, on recevait des parfums de géranium de Turquie et des Indes. Lorsqu'au début du XIX<sup>ème</sup> siècle la senteur rose est très demandée et que celle-ci est très chère, on importe des Indes orientales les « huiles » de géranium rosat. L'extraction de cette huile ne peut se faire que sur matériel frais (DEMARNE, 1985).

Originnaire du cap, cette espèce a été introduite en Algérie en 1865 où elle a acquis des proportions gigantesques durant la période coloniale.

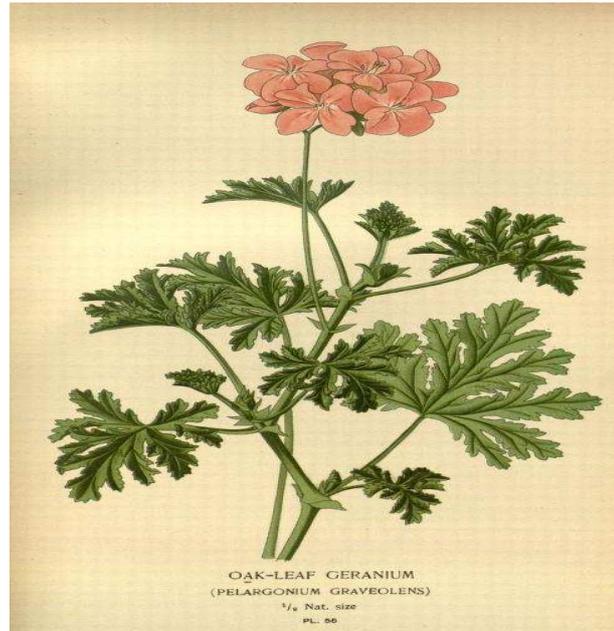


Figure 1: *Pelargonium graveolens* (STEP, 1897).

Aujourd'hui, la culture du géranium rosat (Figure 1), pratiquée sur de petites parcelles dans des conditions de production difficiles, est menacée d'abandon malgré les immenses atouts qu'elle offrait. La distillerie local « Extral Bio » sise à Chiffa (w.Blida), en exploite quelques hectares de géranium destiné à l'extraction de l'HE. La possibilité d'incorporer ces extraits aromatiques dans l'industrie cosmétique constitue une activité plus lucrative pour la société et des études préliminaires sont en cours pour permettre l'application de la qualité des produits finis (BOUKHATEM et *al.*, 2012).

### 1.1.2. Morphologie

Il s'agit d'une plante vivace, pleine de suc en début de végétation, puis ligneuse, à écorce brun clair, cultivée en annuelle ou en pérenne suivant le pays. Ce sont buissons à port érigé, d'environ 60cm et pouvant atteindre 1m30 de hauteur et 60 cm de largeur (DEMARNE, 1986).

Le *P. graveolens* appartient à la catégorie des géraniums à feuillage odorant. Les feuilles persistantes sont lobées (5-7 lobes) et rugueuses, opposées, couvertes de poils glanduleux microscopiques qui libèrent leurs parfums au toucher ou à la chaleur. Les tiges sont vertes et tendres et se lignifient et deviennent plus foncées avec l'âge alors la racine est

de type pivotant. Les fleurs sont groupées par paire, de couleurs rose, disposées en ombrelles et s'épanouissant tout au long de l'année (DEMARNE, 1986).

Le *P.graveolens* est une plante possédant aussi bien des poils glanduleux sécréteurs d'essence que des poils protecteurs et semblent être une protection contre les infestations dues aux pucerons mais améliorant aussi la pénétration des abeilles dans la fleur (DEMARNE, 1985).

### **1.1.3. Culture et phénologie**

Le géranium rosat préfère Les climats subtropicaux et supporte peu les températures inférieures à 3°C bien qu'il soit cultivé sur les hauteurs dans certaines régions (Réunion). Des précipitations de l'ordre de 1000 à 1500 mm d'eau par an sont recommandées. Idéalement, cette plante croît dans des conditions climatiques et édaphiques ni trop humides (favorable au développement de la rouille), ni trop sèches (entraînant un retard de croissance). Mis à part les terres lourdes et asphyxiantes, cette plante à parfum s'adapte à tous types de sols pourvus qu'ils soient correctement drainés, friables et perméables. Le géranium rosat s'adapte très bien aux terres de basses altitudes et à un environnement côtier. Il semble cependant que les huiles extraites de plantes cultivées en altitudes possèdent un parfum de rose plus subtil qu'en basses altitudes (NYABYENDA, 2007).

## 1.2. Origan

### 1.2.1. Histoire

Il y a plusieurs millénaires déjà, les égyptiens traitaient les infections avec de l'huile essentielle d'origan. (LACOSTE, 2010).

**Tableau 2 :** Position systématique de l'*Origanum vulgare* (DEYSSON 1967; FIGUEREDO, 2007).

|                           |                         |
|---------------------------|-------------------------|
| <b>Embranchement</b>      | Spermatophytes          |
| <b>Sous-embranchement</b> | Angiospermes            |
| <b>Classe</b>             | Dicotylédones           |
| <b>Sous-classe</b>        | Gamopétales             |
| <b>Ordre</b>              | Lamiales                |
| <b>Famille</b>            | Lamiaceae               |
| <b>Sous-famille</b>       | Népétoïdées             |
| <b>Genre</b>              | <i>Origanum</i>         |
| <b>Espèce</b>             | <i>Origanum vulgare</i> |

Lorsque la civilisation islamique était à son apogée, les médecins utilisaient déjà l'origan et ses huiles pour traiter les maladies infectieuses. Dans les années 1600, l'herbaliste britannique Gerard faisait la promotion de l'origan comme traitement idéal du rhume de cerveau (ZHIRI, 2006).



Figure 2 : *Origanum glandulosum* (MAHMOUDI, 2011).

Mais, aujourd'hui, les études scientifiques, pharmacologiques et cliniques, se multiplient pour confirmer et expliquer à quel point l'huile essentielle d'origan peut rendre service (LACOSTE, 2010).

*Origanum* vient de 2 mots grecs, « *oros* » qui veut dire montagne et « *ganos* » qui signifie éclat. (FIGUEREDO, 2007).

### **1.2.2. Morphologie**

L'origan est un sous-arbrisseau vivace à port touffu, ne dépassant guère de 60cm de haut. Seuils ovales, opposées, d'un vert tendre, cotonneuses et parfois mouchées, sont portées par des tiges anguleuses rougeâtre, assez pubescentes. En été apparaissent de petites fleurs roses pales, groupées en épis. Toutes les parties de la plantes sont très aromatiques, le parfum de l'origan pouvant varier suivant l'exposition ou le terrain où on la récolté (BOURGEOIS, 2007).

### **1.2.3. Culture et phénologie**

Le genre *Origanum*, appartenant à la famille des lamiacées, comporte 38 espèces qui sont largement répandues dans les régions euro-siberienne et irano-siberienne. Cependant, la plupart des espèces, environ 75% sont concentrées dans le pourtour méditerranéen, en particulier dans les régions méditerranéenne de l'Est. *Origanum vulgare* pousse spontanément dans tout le nord de l'Afrique, en particulier dans les montagnes, à une altitude de 300 à 1600m, surtout dans les endroits rocheux. C'est une espèce endémique en Algérie et en Tunisie et qui pousse au niveau des broussailles et de garrigues (BEKHECHI et al, 2008).

De préférence sur les sols calcaires situés au bord de la mer. On le récolte à la floraison, en été (Larousse 1996).

## 2. Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont définies comme étant des extraits volatils et odorants, que l'on extrait de certains végétaux. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (BRUNETON, 1999).

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les HE ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, ect.). il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante, le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (ANTON et LOBSTEIN, 2005).

### 2.1. Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organe ; fleur (origan), feuilles (citronnelle), écorce (cannelier), bois (bois de rose), rhizomes (acore), fruits (badiane), ou graines (carvi) (MOHAMMEDI. 2006).

La synthèse et l'accumulation des HE sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plantes :

- Les poils glandulaires épidermiques rencontrés souvent chez les Labiaceae, Geraniaceae, et Rutaceae produisent les essences dites superficielles.
- Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant les cellules et les poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les Myrtaceae, Auranthiaceae.
- Les canaux sécréteurs chez les ombelliferaceae, Apiaceae ou Asteraceae (BRUNETON, 1999).

## 2.2. Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les HE en tant que métabolites secondaire. Leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste encore mal connu. Elles peuvent avoir plusieurs effets « utiles » pour la plante à savoir (BAKKALI, 2008) :

- Repousser ou attirer les insectes pour favoriser la pollinisation ;
- Faciliter certaines réaction chimiques et source énergétique ;
- Permettre de conserver l'humidité des plantes désertiques ;
- Réduire la composition des autres espèces de plante par inhibition chimique de la germination des graines ;
- Action répulsive sur les prédateurs par goût et effets défavorable ;
- Protection contre la flore microbienne infectieuse par émission de substances appelées « phytoalexines » (Mann, 1987).

## 2.3. Composition chimique

Les HE sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à deux grands groupes chimiques en fonction de leur voie de biosynthèse, les terpènes et les composés aromatiques dérivés du phényl propane (CROTEAU et al., 2000).

### 2.3.1. L'huile essentielle du géranium rosat

Produite dans des glandes sécrétrices issues de cellules épidermiques des tiges et feuilles, l'huile essentielle est obtenue par entraînement à la vapeur ou par hydrodistillation des parties herbacées fraîches ou légèrement fanées de *Pelargonium x asperum* Ehhert ex Willdenow et de certains hybrides cultivés ayant donné lieu à une formation d'écotypes selon les régions géographiques (AFNOR, 2000). Les teneurs en HE sont très faibles, de l'ordre de 0,15 à 0,2% mais ce taux s'abaisse encore plus durant la saison des pluies. Le rendement dépend également du sol, de l'altitude, de l'exposition, de l'âge de la plante, ainsi que d'autres facteurs. Le temps de distillation est estimé à 2 heures.

Liquide limpide et huileux, l'HE obtenu est de couleur vert jaunâtre à vert brunâtre et possède une forte odeur de rose plus ou moins menthée (AFNOR, 2000).

### 2.3.1.1 Composition chimique de l'huile essentielle du géranium rosat

Le profil chromatographique fait apparaître la présence de certains composants caractéristiques : citronellol, formate de citronellyle, isomenthone, géraniol, linalol, formate de géranyle, oxyde de rose. Le cv bourbon doit contenir du guaiadiène et pas de 10-épi-y-eudesmol alors que c'est l'inverse pour le cv Afrique du nord (AFNOR, 2000).

L'essence de géranium se compose majoritairement de 2 alcools : le géraniol et le citronellol qui existent pour 2/3 à l'état libre et pour 1/3 à l'état combiné sous forme d'esters ; ce sont ces composées oxygénés qui donnent la valeur aux essences de géranium (BOUKHATEM et al., 2010).

### 2.3.1.2. Propriétés de l'huile essentielle du géranium rosat

Le *P. graveolens* se différencie en trois cultivars : cv Chine, cv Bourbon et cv Egypte. L'HE de chacun d'eux est antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire et tonique, mais aussi un hémostatique remarquable. Quelques gouttes de cette HE sur une plaie sanguinolente arrête le saignement et facilite la cicatrisation (PITMAN, 2004).

### 2.3.2. L'huile essentielle d'origan

Longtemps employé pour ses effets incontestables sur la digestion et contre les inflammations des bronches, toujours bienvenu dans la cuisine pour aromatiser les viandes, les soupes et les salades, l'origan a pris un nouvel essor ces dernières années avec les nombreuses recherches consacrées à son huile essentielle. Elle est sans doute à l'origine de bien des indications de l'origan, mais, surtout, elle se montre redoutable envers des bactéries qui résistent aux traitements antibiotiques. De nos jours, c'est un atout essentiel (LACOSTE, 2010).

#### 2.3.2.1. Composition chimique de l'huile essentielle d'origan

L'huile essentielle de l'origan est composée de (Carvacrol, thymol, tanin, substance amer, saponosides, gomme ou résine, acides phénols, flavonoïdes, triterpènes, aromadendrine). (HMAMOUCHE, 1997).

### 2.3.2.2. Propriétés de l'huile essentielle d'origan

Dans l'huile essentielle d'origan, l'un des ses composants, le carvacrol, est sans doute à l'origine de son étonnante efficacité. Il s'agit d'un composé phénolique (un antioxydant puissant) qui possède des propriétés antibactériennes à large spectre (c'est-à-dire efficaces sur un maximum de bactéries différentes). Il inhibe ou détruit aussi de nombreux virus, les moisissures et les champignons. Autre composant : le thymol de l'huile essentielle d'origan est également un antibactérien, antiviral et antifongique reconnu (LACOSTE, 2010).

## 2.4. Notion de chémotype

Le chémotype d'une HE est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif présent dans l'HE. C'est l'élément qui permet de distinguer des HE extraites d'une même variété botanique, mais d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les HE pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les HE à chemotypes différents présentent non seulement des activités différentes, mais aussi des toxicités très variables (PIBIRI, 2005).

## 2.5. Méthodes d'extraction

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique, différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants (GARNERO, 1977).

### 2.5.1. Distillation

Il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : L'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

- **Hydrodistillation**

Il s'agit de la méthode la plus simple qui était proposée par Garnier en 1991. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'HE se sépare de l'hydrolysate par simple différence de densité.

L'HE étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolat. Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (LUCCHESI, 2005).

- **Distillation par entraînement à la vapeur d'eau**

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de L'HE en minimisant les altérations hydrolytiques (PIOCHON, 2008).

- **Hydrodiffusion**

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc, moins de dommage pour les composés volatiles (PIOCHON, 2008).

### **2.5.2. Extraction par fluides supercritiques**

La technique a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. En outre, tous les processus de dégradation possible tels que l'oxydation ou isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y est réduit (PIOCHON, 2008). Toutefois, cette technique d'extraction présente un inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique qui est le solvant d'extraction le plus employé. Au-delà du point critique ( $p=$

73,8 bars,  $T^{\circ}= 31,1^{\circ}\text{C}$ ), le  $\text{CO}_2$  possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (PIOCHON, 2008).

### **2.5.3. Extraction assistée par micro-ondes**

Une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante.

Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques, condensation, refroidissement et décantation (HEMWIMON et *al.*, 2007).

### **2.5.4. Extraction à froid**

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (ROUX, 2008).

### **2.5.5. Extraction par solvants organique**

C'est la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone (LEGRAND, 1993 ; DAPKEVICIUS et *al.*, 1998 ; KIM et LEE, 2002).

## **2.6. Activité antimicrobienne**

En phytothérapie, les HE sont utilisées contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, comme les bactéries endocanaliaires ou la microflore vaginale, ou d'origine fongique comme les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes (BILLERBECK, 2002). Elles représentent aussi des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (BILLERBECK, 2007). Cette activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique (notion de chémotype) et en particulier de leurs composés volatils majeurs (MEBARKI, 2010).

### 2.6.1. Activité antibactérienne :

La première mise en évidence de l'action des HE contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (BOYLE, 1955). Depuis de nombreuses huiles ont été définies comme antibactérienne (BURT, 2004). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactérie, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une HE à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (KALEMBA et KUNICKA, 2003). Les HE agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (BURT, 2004). Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatifs est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer (CRISTIANI et *al.*, 2007). La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *Pseudomonas aeruginosa* (DORMAN et DEANS, 2000).

La croissance des bactéries, résistantes et multirésistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines HE. Les huiles d'Agrumes, de Lavande, de Menthe, de Genévrier, de l'Arbre à thé, de Thym et d'Eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les Staphylocoques dorés résistant à la méthicilline (MAY et *al.*, 2000 ; TOHIDPOUR et *al.*, 2010) et les entérocoques résistants à la vancomycine (FISHER et PHILLIPS, 2009).

### 2.6.2. Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les HE pourraient également être employées comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (LIS, 2002).

Le pouvoir antifongique des HE de certaines plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes (DE BILLERBECK et *al.*, 2002 ; KOBAYASHI et *al.*, 2004 ; OURAINI et *al.*, 2005) et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* (TEIXEIRA-DUARTE, 2005).

### 2.6.3. Activité antivirale

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des HE telles que les monoterpénols et les monoterpénales. De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des HE ont montré des améliorations importantes. L'effet antiviral de l'HE de *Mentha piperita* a été étudié « in vitro » contre les virus de Herpes Simplex, une inhibition, une inhibition de 50% est obtenue avec des concentrations entre 0,002% et 0,008% (SCHUHMACHER et REICHLING, 2003).

### 2.7. Activité insecticide : mécanismes d'action :

Les huiles essentielles représentent une piste d'avenir et les recherches sur les extraits d'huiles sont nombreuses, Toutefois, la grande majorité de ces études portaient sur les moustiques, que ce soit sur l'effet répulsif des huiles essentielles ou sur leur effet larvicide (NTONIFOR et al., 2006) toutefois le mode d'action des huiles essentielles est relativement peu connu chez les insectes (BEKELE et HASSANALI, 2001) (ISMAN, 2000).

### 2.8. Toxicité des huiles essentielles

Certaines huiles essentielles, comme l'origan, sont dermocaustique et donc capables de brûler la peau, c'est pourquoi il ne faut jamais les utiliser pures. L'huile essentielle doit être diluée dans une huile végétale à dose infime.

Certaines d'entre elles sont irritantes, voir allergènes, à cause de molécules comme les terpènes et la térébenthine. A titre d'exemple, l'huile essentielle de rose contient dans sa composition six des vingt-six allergènes pointés du doigt par la législation : citral, citronellol, eugénol, farnésol, géraniol et linalol. C'est pourquoi il faut toujours faire un test sur une petite partie de votre corps quand vous essayez un nouveau cosmétique à base d'huile essentielle. (SAYOUS et CHEVALLIER, 2009).

## 1. Généralité sur les *Culicidae*

Les moustiques sont des vecteurs de beaucoup de maladie à transmission vectorielle affectant les êtres humains et les animaux. Ils constituent un problème majeur de santé publique. Parmi les espèces les plus répandus dans le monde nous avons le *Culex pipiens*, *Culex hortensis*, *Culex quinquefasciatus* (MOHAN, 2007).

### 1.2. Morphologie

#### 1.2.1. L'adulte

Son corps est divisé en trois parties tête thorax et abdomen :

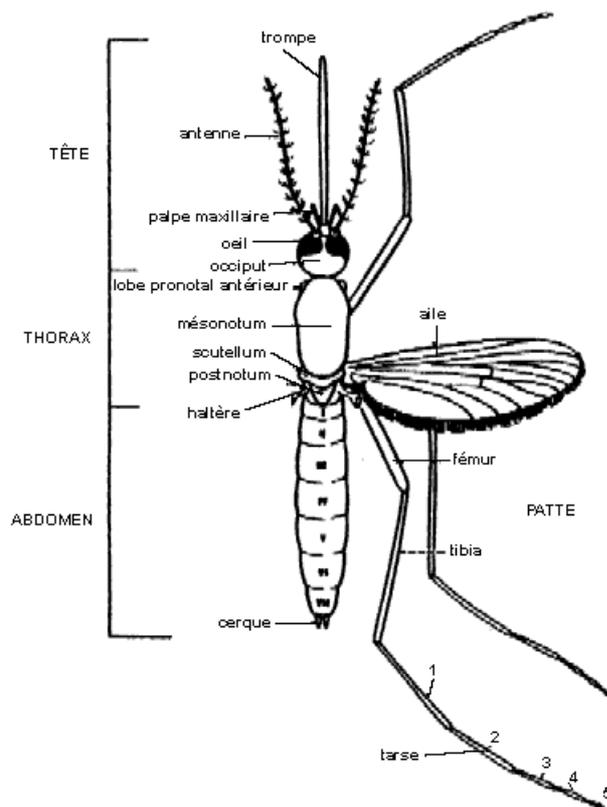


Figure 3 : Principales parties du corps du moustique adulte (Bussieras, 1991).

#### a- La tête

Elle est de forme globuleuse et bien dégagée du thorax, portée par un cou étroit, de couleur sombre, couverte d'écailles fourchues dressées et sombres entre lesquelles sont

situées des écailles blanches et des poils bruns. Sur les joues se trouvent des écailles plus courtes formant une tache blanche (KETTLE, 1995 ; ANDREO, 2003).

Les yeux sont très grands, réniformes juxtaposés et occupent la majeure partie de la tête. Les yeux sont composés d'yeux élémentaires appelés ommatidies. Les antennes, implantées dans la région faciale sont formées de plusieurs segments et d'un bourrelet d'insertion globuleux, appelé le scape. Un deuxième segment allongé, le torus renferme l'organe auditif de Johnston qui est plus développé chez le mâle. Une troisième partie, le flagellum ou flagelle composé d'articles de nombre variable selon les sexes. Entre chaque article s'insèrent des soies courtes.

Chez les femelles les antennes sont glabres cependant chez les mâles les antennes sont plumeuses (ANDREO, 2003).

La trompe ou proboscis est un organe impair situé dans la partie inféro-médiane. Sa structure est différente selon les sexes :

- Chez les femelles hématoiphages le proboscis est composé :

De 3 pièces impaires qui sont de haut en bas : l'épipharynx, l'hypopharynx et le labium.

De 4 pièces paires et symétriques représentées par deux mandibules en haut et deux maxilles en bas. Toutes ces pièces pénètrent dans la plaie lors de la piqûre sauf le labium qui se coude ce dernier, forme la gaine de la trompe et enveloppe donc toutes les autres pièces.

- Chez le mâle, qui ne se nourrit pas de sang mais de suc végétaux, seuls persistent l'épipharynx et le labium. Les autres pièces buccales forcées sont atrophiées, les deux palpes maxillaires situés de part et d'autre de la base de la trompe, sont des organes tactiles formés de 3 ou 4 articles. Elles sont de même longueur que la trompe ; chez les mâles, l'extrémité distale est aplatie en raquette (RIOUX, 1958).

### **b- Le thorax**

Il se compose de trois segments soudés à savoir : le prothorax, le mésothorax et le métathorax, il porte les ailes et les pattes (BUSSIERAS & CHERMETTE, 1991).

### c- L'abdomen

Grêle et allongé, il est composé de 9 segments terminés par 2 cerques, appendices courts protégeant l'anus et l'orifice génital. Il est recouvert d'écailles claires, brunes et blanches avec de longs poils sur la face dorsale. Une ligne longitudinale sombre ainsi que quelques taches sombres sur les côtés ornent la face ventrale. Chez les mâles, l'abdomen se termine en une armature génitale servant à maintenir la femelle durant l'accouplement. Chez les femelles, on trouve un oviscapte qui intervient lors de la ponte (BUSSIERAS et CHERMETTE, 1991).

#### 1.2.2. Les œufs

Les œufs, ont un diamètre inférieur à 1mm (ANDREO, 2003). Ils sont de couleur noire facilement visible à l'œil nu. Ils sont détruits très rapidement en d'assèchement (GUILLAUMOT, 2005). Une femelle peut pondre jusqu'à 300 œufs (URQUHART. et al, 1996), qui éclosent en 24 à 48 heures lorsque la température de l'eau est adéquate.

#### 1.2.3. La larve

Les larves de genre *Culex* se développent indifféremment dans les eaux claires ou polluées. D'aspect vermiforme, son corps se divise en trois segments : la tête, le thorax et un abdomen souple. Sa taille varie de 2mm à 12mm en moyenne en fonction des stades et en fonction des espèces. Elle est dépourvue d'appareil locomoteur. Son extrémité caudale est munie d'un siphon, ou tube respiratoire, long et étroit affleurant à la surface de l'eau. Ce tube est muni de 5 clapets qui s'ouvrent sur deux orifices par où l'air pénètre à l'intérieur quand la larve monte à la surface de l'eau, et se rabattent quand elle gagne les profondeurs (GABRIEL, 2008). Ses pièces buccales sont de types broyeurs, adaptées à un régime saprophyte (KETTLE, 1995). Elles se nourrissent de bactéries et de plancton (URQUHART, 1996).

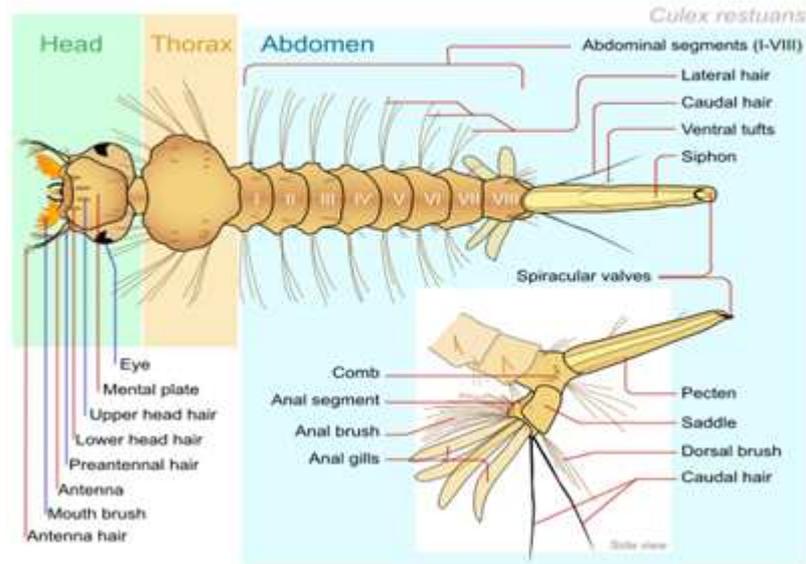


Figure 4 : Structure d'une larve de *Culex* (HARBACH, 2008).

#### 1.2.4. La nymphe

La nymphe des Culicidae ou pape en anglais, se caractérise par une tête et un thorax réunis en une seule masse globuleuse, le céphalothorax, et une partie postérieure effilée et recourbée constituant l'abdomen ; ce dernier donne à la forme générale de la nymphe un aspect d'une virgule. Sur le sommet et la portion céphalothoracique se projettent deux trompettes respiratoires de forme très variables souvent longues et cylindriques équivaux physiologiquement au siphon respiratoire de la larve. L'abdomen de la nymphe de Culicidae est composé de huit segments visibles où chacun d'eux porte des soies caractéristiques. Une soie palmée se trouve généralement au niveau du premier segment, cependant le dernier segment est muni de deux palette natatoires transparentes souvent ornées de denticules et de soies (HEGH, 1921 ; RODHAIN et PEREZ, 1985).

### 1.3. Position systématique

**Tableau 3** : Position systématique du *Culex pipiens*. (LANE et CROSSKEY, 1993)

|                           |                      |
|---------------------------|----------------------|
| <b>Règne</b>              | Animalia             |
| <b>Embranchement</b>      | Arthropoda           |
| <b>Sous-embranchement</b> | Hexapoda             |
| <b>Classe</b>             | Insecta              |
| <b>Sous-classe</b>        | Pterygota            |
| <b>Ordre</b>              | Diptera              |
| <b>Sous-ordre</b>         | Nematocera           |
| <b>Famille</b>            | Culicidae            |
| <b>Sous-famille</b>       | Culicinae            |
| <b>Genre</b>              | <i>Culex</i>         |
| <b>Espèce</b>             | <i>Culex pipiens</i> |

### 1.4. Le cycle de développement

Les moustiques, comme tous les diptères, sont des insectes holométaboles à métamorphose complète, la larve et l'adulte ont un aspect et un mode de vie très différents (GUILLAUMOT, 2005). On distingue quatre stades dans le cycle de développement : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte ou imago. En général, les femelles ne s'accouplent qu'une seule fois mais pondent périodiquement pendant toute leur existence.

Pour y parvenir, la plupart d'entre elles doivent prendre un repas de sang. Les mâles ne sont pas hématophages ; ils se nourrissent de sucs d'origine végétale (OMS, 1999).

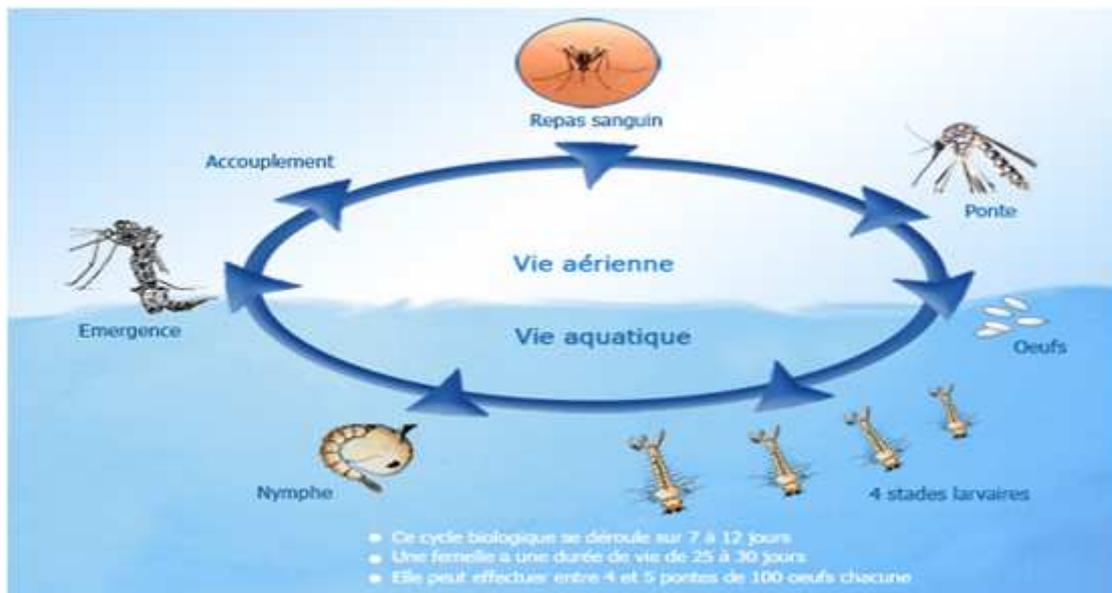


Figure 5 : Cycle de développement du moustique (ILM, 2014)

#### 1.4.1. La phase aérienne

Le mâle et la femelle en général s'accouplent d'abord en vol puis sur le sol. La femelle détient la particularité en vie jusqu'à sa mort les gamètes mâles dans une ampoule globulaire appelée spermathèque. Grâce à cette caractéristique, les femelles ne s'accouplent qu'une fois et ce sont les repas de sang qui apportent les substances nutritives indispensables à chaque maturation ovarienne. Les œufs fécondés sont pondus à la surface d'eau où ils poursuivent leur embryogénèse (DARRIET, 1998).

#### 1.4.2. La phase aquatique

Les œufs fécondés donnent naissance à des larves, la larve qui en sort mesure 1 à 2 mm de long. Pour atteindre sa taille maximum, soit 8 à 12 mm, elle devra muer 3 fois. Les larves se nourrissent de matière organique, de microorganismes et même de proies vivantes, elle respire l'air atmosphérique en surface grâce à son siphon.

Au bout de 6 à 10 jours ou plus selon la température de l'eau et la disponibilité en nourriture, la 4<sup>ème</sup> mue donne naissance à une nymphe, qui est au moustique ce que la chrysalide est au papillon. C'est le stade correspondant à la surface de l'eau au moyen de petits appendices appelés trompettes, mais ne s'alimente pas (GUILLAUMOT, 2005).

L'émergence, qui dure entre 3 et 4 minutes, est le moment le plus fascinant à observer de la vie du moustique. La nymphe s'immobilise à la surface de l'eau ; le dos du thorax se fend et s'ouvre tandis qu'une sorte de cire empêche l'eau de pénétrer, et le moustique adulte savoir imago s'élève lentement. D'abord le thorax, puis la tête et l'abdomen (DIARRIET, 1998).

Les pattes, les antennes et la trompe se déroulent et les ailes, minuscules au début, se gonflent littéralement quand l'air pénètre dans les veines par les trachées. C'est aussi le moment le plus délicat dans la vie du fragile insecte : immobilisé, il est à la merci de n'importe quel prédateur ou même d'une simple rafale de vent. La mortalité durant cette phase est souvent élevée.

Quand l'opération est terminée, le jeune moustique se tient quelques minutes, ses pattes en suspension sur la surface de l'eau, attendant que sa cuticule toute neuve durcisse au contact de l'air. Puis, il s'envole, laissant derrière lui la peau morte de la nymphe (GUILLAUMOT, 2005).

### 1.5. Le complexe *Culex pipiens*

Le complexe *Culex pipiens* regroupe plusieurs espèces : *Cx. pipiens* (Linnaeus, 1758) avec ses deux formes ; la forme pipiens et la forme molestus (Forskall, 1775), *Cx. quinquefasciatus* (Say, 1823), *Cx. pallens* (Coquillett, 1898), *Cx. Globocoxitus* (Dobrotworsky, 1953) et *Cx. australicus* (Dobrotworsky et Drummond, 1953). D'autres espèces sont étroitement liées ou suggérées appartenir à ce complexe telle que, *Cx. Vagans* (Wiedemann, 1828), *Cx. Fatigans* (Wiedemann, 1828), *Cx. Pervigilans* (Von Bergroth, 1889) et *Cx. Torrentium* (Martini, 1925), (VINOGRADOVA 2003 ; SMITH & FONESECA, 2004).

Le moustique *Culex pipiens* (L). existe sous deux formes molestus et une forme pipiens. La forme molestus est autogène (capable de réaliser une première ponte sans prendre de repas de sang), sténogame (peut s'accoupler dans des espaces confinés) et reste en activité durant la période hivernale (homodynamique). A l'inverse, la forme pipiens est anautogène (exigeant toujours un repas de sang pour réaliser une ponte), eurygame (s'accouple en plein air) et entre en diapause pendant l'hiver (hétérodynamique). (BYRNE & NICHOLS, 1999).

## 1.6. Principales nuisances causés par le *Culex*

On distingue deux types de nuisance causée par le *Culex* : La piqure et la transmission de maladie.

### 1.6.1. La piqure

Chez l'homme comme chez l'animal, la piqure du moustique femelle provoque une lésion ronde de quelques mm à 2cm de diamètre souvent prurigineuse (ANDREO, 2003).

Des réactions allergique à ces piqures peuvent apparaitre, dues à l'injection d'antigènes salivaires, mais pouvant aussi être dues au simple contact avec le moustique ou ses excréments (CANDACE, 2001).

### 1.6.2. La transmission des maladies

Le *Culex pipens*, est très répandu dans le monde. Il est présent en zones tropicales et tempérées (WEILL et *al.*, 2003). C'est une espèce qui se reproduit dans des habitats naturels et artificiels de différentes tailles (SAVAGE & MILLER, 1995).

Sa capacité à s'adapter à tous les biotopes (HASSAINE, 2002 ; FARAJ et *al.*, 2006) lui permet d'être vecteur de plusieurs agents pathogènes responsables de maladies infectieuses parfois mortelles (GUYATT et *al.*, 1999).

Selon Savage et Miller (1995), *Culex pipens* est l'un des principaux vecteurs de l'encéphalite de saint-louis aux États-Unis, il a été considéré aussi comme le principal vecteur du virus West-Nile en Roumanie (SAVAGE et *al.*, 1999), aux États-Unis, en Bulgarie et en république tchèque (HUBALEK & HALOUZKA, 1999).

En Algérie, le virus West-Nile a provoqué une épidémie importante dans la région de Timimoune en 1994, des cas isolés d'encéphalite chez l'homme avec des cas mortels sont rapportés par ZIENTARA et *al.*, (2001).

De même, en Algérie, *Culex pipens* est le moustique qui présente le plus d'intérêt en raison de son abondance et sa nuisance réelle dans les zones urbaines (Berchi, 2000). Selon ce

même auteur, son développement dans certaines régions est continu pendant toute l'année. De nombreux travaux sur la population de *Culex pipens* des régions tempérées ont été entrepris pour examiner les critères de différenciation morphologique entre les biotypes (ROUBAUD, 1929).

## 2. Généralité sur les microorganismes utilisés

### 2.1. Les bactéries Gram positifs

#### 2.1.1. *Staphylococcus aureus*

Parfois appelé « staphylococcus doré pathogène ». appartenant à la famille des *Micrococcaceae*. C'est un coccus à catalase (+), coagulase (+), facultativement anaérobies. Elles sont groupées en amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec staphylos). Ils sont immobiles et se cultivent sur des milieux contenant 5% de Na Cl. C'est un germe ubiquiste, la plupart des individus sont colonisés de façon intermittente ou permanente par cette bactérie au niveau du nasopharynx de la peau des vêtements.

Ils peuvent entraîner une lésion locale à type d'abcès à partir de cette multiplication locale, ce germe peut ensuite gagner le courant sanguin et entraîner des complications métastatique (RAOULT, 1999).

Un aliment faiblement contaminé lors de la préparation et conservé à température ambiante qui permet la multiplication d'une souche produisant l'entérotoxine peut être responsable d'une toxi-infection alimentaire collective (AVRIL, et FAYCHERE, 2002).

Elle acquiert facilement une résistance aux antibiotiques et en particulier à la pénicilline et à la méthicilline (HAXHE et ZUMOFEN, 1999).

#### 2.1.2. *Streptococcus pneumoniae*

Ce sont des cocci ubiquitaire, disposés en paire pour former des diplocoques et pouvant se présenter sous forme de chaînettes parfois longues, asporulés, catalase (-) (à la différence des staphylocoques), oxydase (-), anaérobies aérotolérantes c'est-à-dire incapables d'utiliser

l'oxygène mais multiplie en sa présence, se cultive bien dans une atmosphère contenant du CO<sub>2</sub> (COWAN, 1999).

Les espèces du groupe des Entérocoques n'ont pas un rôle important dans les infections mais sont quelquefois isolées dans les endocardites et les infections urinaires. Ils sont recherchés aussi comme indicateurs de contamination fécale des eaux de consommation et des produits alimentaires (LECLERC et al, 1995).

### **2.1.3. *Enterococcus faecalis***

*E. faecalis* est l'espèce du genre *Enterococcus*, la plus fréquemment isolée chez l'homme. Coques d'aspect ovoïde en courtes chaînes, immobile en bouillon et acapsulés.

Anaérobies facultatifs aérobies tolérants. *E. faecalis* fait partie de la flore digestive de l'homme et des animaux.

*E. faecalis* est principalement responsable d'infections urinaires le plus souvent secondaires après explorations urologiques, d'endocardites évoluant sur un mode subaiguë, sur valves natives ou sur prothèses, et survenant après explorations digestives ou urologiques, d'infections intra abdominales (biliaires,...) de suppurations diverses. Le caractère polymicrobien des surinfections à Entérocoques est fréquent (entérobactéries et anaérobies).

Les urines, les hémocultures, les pus sont les prélèvements principaux où *E. faecalis* peut être retrouvé (ARCHAMBAUD et CLAVE, 2007).

## **2.2. Les bactéries Gram négatif**

### **2.2.1. *Escherichia coli***

ce sont des bacilles droits, appartenant à la famille des Entérobactéries, mobiles, enveloppés d'une paroi fine et complexe parfois capsulés, une couche de peptidoglycane adhère à la membrane externe, aérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates (ALLOU et NADJARI, 2002).

*E. coli* fait partie de la microflore bactérienne normale du tractus digestif de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud. Il est le premier germe responsable de l'infection

urinaire, de l'infection materno-fœtale, de prostatite, de suppurations divers à partir de la flore digestif, toutes ces infections peuvent se compliquer en septicémie.

Même si la majorité des souches sont commensales banales, quelques unes sont toutefois à l'origine de pathologies intestinales ou extra intestinales, la présence d'*E.coli* dans l'environnement est le témoin d'une contamination fécale (LARPENT, 1990).

### **2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa***

Ce genre appartient à la famille des Pseudomonadaceae. Ce sont des bacilles incurvés, mobile grâce à un flagelle polaire, strictement aérobie, donnent des colorations bleu ou jaune verdâtre lors d'une culture sur gélose, certaines espèces comme *P.aeruginosa* sont capables de se cultiver à 41°C et même à 43°C, ce caractère étant utilisé pour le diagnostic.

Elles sont ré pondues dans les sols et dans les eaux douces et salées (LECLERC *et al.*, 1995).

Elles sont principalement des agents des altérations superficielles des aliments réfrigérés : viandes, volailles, poissons, lait et œufs (AIT ABDELOUHAB, 2001).

Ce sont des bactéries pathogènes des animaux et des végétaux. Elles infectent les personnes les moins résistantes, envahissant les tissus brûlés et causent des infections des voies urinaires (KLEIN, 1995).

## **2.3. Levures**

### **2.3.1. *Candida albicans***

Ce sont des levures ovales bourgeonnantes qui produisent des pseudomycéliums en culture. Elles sont présentes sur la peau, dans la bouche et l'intestin. Elles peuvent devenir dangereuses suite à un changement de l'environnement. Elles attaquent le tube digestif et la vessie.

La dissémination hémotogène peut entraîner des lésions au niveau des reins, de la rate, des poumons et du foie (LARPENT, 1990).