

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB – BLIDA 1



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET  
DE LA VIE

DEPARTEMENT DE Biotechnologie et  
Agro-environnementaux



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Master académique en  
Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité: Phytopharmacie et Protection des Végétaux

Thème

Potentialité biocides et antioxydante des huiles essentielles de  
*Rosmarinus officinalis* et de *Rosmarinus tournefortii* issues de  
différents modes culturaux.

Présenté par :

Melle MERSELLEM SAIDA et Melle BOUNEDJAR CHAFIQA.

Soutenu : le22/09/2021.

Devant le jury composé de :

Mr MOUSSAOUI. K	M .A. A	U.Blida1	Président
Mme BABA AISSA. K	M .A. A	U.Blida1	Examinatrice
Mr DJAZOULI Z, E	Professeur	U.Blida1	Promoteur
Mme GUESMI F	Doctorante	U.Blida1	Co -Promotrice

Année Universitaire 2020-2021.

## REMERCIEMENT

Au terme de ce modeste travail, Mes premiers remerciements s'adressent à **ALLAH** de m'avoir donné la foi, la force, la patience, et le courage pour avoir réalisé ce travail.

J'exprime aussi ma gratitude à **Mr. DJAZOULI Z. E.**, Professeur à l'université de **BLIDA 1**, qui m'a fait l'honneur d'être mon promoteur ; ainsi que pour l'intérêt qu'il a apporté à la réalisation de ce travail. Je le remercie chaleureusement pour ses encouragements, orientations, aide, précieux conseils, patience et aussi pour sa disponibilité et sa gentillesse.

J'adresse mes sincères remerciements à ma notre Co- promotrice, **Mme GUESMI.F.**, pour avoir bien voulu m'encadrer, pour ses précieux conseils, pour son aide, sa patience, et son suivi tout au long de la réalisation de ce mémoire. J'espère qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie également **Mr MOUSSAOUI K.**, d'avoir accepté de présider mon jury soutenance et pour ses conseils judicieux et surtout son soutien et ses apports tant enrichissants.

MERCI à Madame **BABA AISSAK.**, pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce mémoire. Un grand merci également à Mme **DJAMAI YAMINA** La technicienne du laboratoire de zoologie. En particulier **Mr GHARBI .Y.**, **Mme IKRAM** ; **Dr. SARMOUM** et

**Mr. FALAGUE.**

Je tiens a remercié tous mes amis et en particulier **SACIR, AWAD A, ACHOURM et M, BENWAHLIMA S**, aussi je remercie les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

## *DÉDICACE*

*Avec l'aide de dieu, J'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à la mémoire*

*De mon généreux père. Aucune dédicace ne serait exprimer l'amour*

*Et le respect que j'ai toujours eu pour lui. Il a tant espéré me voir soutenir et*

*Atteindre l'objectif.*

*A celle qui m'a toujours encouragé et aider durant mes années d'études. Merci*

*Pour ton amour et ta confiance totale*

*À toi ma très chère maman Zahra et mon cher papa Ben Ali et mon autre maman  
Khadîdja.*

*A mes chères sœurs : Hanane, Fatima, et Sabrina*

*A mes chers frères : Abdenour et Abderazak*

*Amonbinôme:MERSELLEM Saida.*

*A mes chères amies : Saliha, Zahra, Bouchra*

*A mes camarades de promotion de 2ème année master « phytopharmacie et*

*Protection des végétaux ».*

*A ceux qui ont attribué de près ou de loin à*

*L'élaboration de ce modeste travail.*

*CHAFIQA.*

## **DEDICACES**

*Ce travail, et bien au –delà, je le dois à mes très chers parents qui m’ont fourni au quotidien un soutien et une confiance sans faille et de ce fait, je ne saurais exprimer ma gratitude seulement par des mots .que Dieu vous protège et vous garde pour nous.*

*Je le dédie particulièrement*

*A mon unique et adorable sœur fatma Zohra et son mari Rachid et ses filles Ritedj, Roaa, Ratil.*

*A mes aimables frères TOUFIK et FATEH.*

*Les filles de mon frère, Mustafa, Meriem et Anfal.*

*Les enfants de mon frère Mohammed Abdul-Mumin, Islam et Rahaf.*

*A mon binôme Bounedjar chafiq.*

*A mes oncles et tantes.*

*A tous mes cousin et cousines.*

*A tous mes amis avec lesquels j’ai partagé mes moments de joie et de bonheur, particulièrement\* Rahil Benaoud\*, \*Sahali Sabrina\*, \*Dellel Hamida\*, et \*Bouziyani Houria\*.*

**SAIDA.**

# POTENTIALITE BIOCIDES ET ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* ET DE *ROSMARINUS TOURNEFORTEII* ISSUES DE DIFFERENTS MODES CULTURAUX

## RESUME

Les produits d'origine naturelle occupent une place importante dans la découverte de nouveaux composés utiles pour l'humain. Les ressources végétales et même animales du territoire Algérien sont des immenses réservoirs de composés méconnus avec un fort potentiel d'utilisation.

Dans le cadre de cette étude nous nous sommes fixés comme objectif est d'évalué l'activité larvicide et anti oxydante des huiles essentielles de deux espèces du Romarin (*Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii*) soumis à différents modes de stimulation(Lombricompost solide, lombricompostliquide, NaCl, l'eau de ville)par application foliaire des stimulateurs sur les plantes modèles adultes .Enfin leurs effet sur les activités biologiques.

L'évaluation et l'optimisation de l'activité biocide des huiles essentielles formulées sur les larves *Culex pipiens* du quatrième stade en comparaison avec un bioinsecticide d'origine bactérien (Spinosad).Les huiles essentielle du romarinsont obtenues par hydro-distillation des parties aériennes sèches. Les tests de sensibilité ont été réalisés conformément au protocole mondial de la santé.

Les résultats obtenus ont montré une activité bioinsecticide très remarquable pour l'ensemble des huiles essentielles formulées appliqués par rapport aux résultats obtenus de l'application du témoin positif et négatif et du Spinosad.

Cependant, les mêmes résultats font apparaitre que l'efficacité de huile essentielle augmente sous l'effet stimulateur pour les deux espèces du Romarin par rapport au témoin (Romarin non traité), les résultats de l'activité larvicide par contact a dénoncé que l'activité des huiles essentielles formulées était liée à l'effet stimulateur. La toxicité des différents traitements et du Spinosad évoluent avec l'augmentation de la dose.

Les résultats de l'activité antioxydante mesurée en utilisant le test de piégeage du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) montrent que les huiles essentielles testées ont une activité antioxydante modérée, relativement faible comparées à l'antioxydant de référence.

En comparant les résultats obtenus, l'activité antioxydante est classée suivant l'ordre : Vitamine C > *Rosmarinus officinalis*> *Rosmarinus tournefortii*.

**Mots clés :**Activité biocide, Activité antioxydante ,DPPH,*Culex pipiens* ,*Rosmarinus officinalis*, *Rosmarinus tournefortii*.

# BIOCIDAL AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF ESSENTIAL OILS OF ROSMARINUS OFFICINALIS AND ROSMARINUS TOURNEFORTEII FROM DIFFERENT CULTIVATION METHODS

## ABSTRACT

Products of natural origin occupy an important place in the discovery of new useful compounds for humans. The plant and even animal resources of the Algerian territory are immense reservoirs of unknown compounds with a strong potential of use.

In the framework of this study, we set ourselves the objective of evaluating the larvicidal and anti-oxidant activity of essential oils of two Rosemary species (*Rosmarinus officinalis* and *Rosmarinus tournefortii*) subjected to different modes of stimulation (solid vermicompost, liquid vermicompost, NaCl, city water) by foliar application of the stimulators on adult model plants and their effect on biological activities.

The evaluation and optimisation of the biocide activity of the formulated essential oils on fourth instar *Culex pipiens* larvae in comparison with a bacterial bioinsecticide (Spinosad). The essential oils of rosemary are obtained by hydro-distillation of the dry aerial parts. Sensitivity testing was carried out in accordance with the Global Health Protocol.

The results obtained showed a very remarkable bioinsecticidal activity for all the formulated essential oils applied compared to the results obtained from the application of the positive and negative control and Spinosad.

However, the same results show that the efficacy of the essential oil increases under the stimulatory effect for both Rosemary species compared to the control (untreated Rosemary), the results of the contact larvicidal activity indicated that the activity of the formulated essential oils was related to the stimulatory effect. The toxicity of the different treatments and of Spinosad evolved with increasing dose.

The results of the antioxidant activity measured using the diphenylpicrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging test show that the essential oils tested have a moderate antioxidant activity, relatively low compared to the reference antioxidant.

Comparing the results obtained, the antioxidant activity is ranked in the order: Vitamin C > *Rosmarinus officinalis* > *Rosmarinus tournefortii*.

**Keywords:** Antioxidant activity ,biocide activity ,DPPH,*Culex pipiens*, *Rosmarinus officinalis* , *Rosmarinus tournefortii*.

# الإمكانية البيولوجية ومضادات الأكسدة للزيوت الأساسية لنوعين من إكليل الجبل يتعرضان لأنماط مختلفة من التحفيز على يرقات *Culex pipiens*

## ملخص

تلعب المنتجات ذات الأصل الطبيعي دورًا مهمًا في اكتشاف مركبات جديدة مفيدة للإنسان. تشكل الموارد النباتية وحتى الحيوانية في الأراضي الجزائرية مستودعات هائلة لمركبات مجهولة ذات إمكانات قوية للاستخدام.

كجزء من هذه الدراسة، وضعنا هدفًا يتمثل في تقييم نشاط مييد اليرقات ومضادات الأكسدة للزيوت الأساسية لنوعين من إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis* و *Rosmarinus tournfortii*) المعرضين لأنماط مختلفة من التحفيز (السماذ الدودي الصلب، السماذ الدودي السائل، NaCl، المدينة الماء) عن طريق الرش الورقي للمنبهات على النباتات البالغة وأخيرًا تأثيرها على الأنشطة البيولوجية. تقييم وتحسين فعالية مييد اليرقات للزيوت العطرية المركبة على يرقات *Culex pipiens* من المرحلة الرابعة مقارنة بمبيد حشري حيوي من أصل بكتيري (Spinosaad) يتم الحصول على الزيوت الأساسية لإكليل الجبل عن طريق التقطير المائي لأجزاء الهواء الجاف. تم إجراء اختبار الحساسية وفقًا لبروتوكول الصحة العالمية.

ظهرت النتائج التي تم الحصول عليها نشاط مييد حيوي ملحوظ للغاية لجميع الزيوت الأساسية التي تم استخدامها بالإضافة إلى النتائج التي تم الحصول عليها من تطبيق الضبط الإيجابي والسلبي والسبينوساد.

ومع ذلك، تظهر نفس النتائج أن فعالية الزيت العطري تزداد تحت التأثير التحفيزي لنوعي إكليل الجبل مقارنةً بالسيطرة (إكليل الجبل غير المعالج)، ونتائج نشاط مييد اليرقات عن طريق التلامس تدل على أن نشاط الزيوت العطرية المركب كان يرتبط بالتأثير التحفيزي. سمية العلاجات المختلفة والسبينوساد تتغير مع زيادة الجرعة.

تُظهر نتائج نشاط مضادات الأكسدة التي تم قياسها باستخدام اختبار الكسح الجذري ثنائي الفينيل بيكريل هيدرازيل (DPPH) أن الزيوت الأساسية التي تم اختبارها لها نشاط مضاد للأكسدة معتدل، منخفض نسبيًا مقارنة بمضادات الأكسدة المرجعية.

من خلال مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها، يتم تصنيف النشاط المضاد للأكسدة بالترتيب التالي:  
فيتامين ج، *Rosmarinus officinalis*، *Rosmarinus tournfortii*.

**الكلمات المفتاح:** نشاط مييد حيوي، نشاط مضادات الأكسدة، ثنائي الفينيل بيكريل هيدرازيل (DPPH)، *Rosmarinus officinalis*، *Culex pipiens*، *Rosmarinus tournfortii*.

## LISTE DES FIGURES ET GRAPHIQUES

Figure 01 : Composés phénoliques caractéristiques des extraits de Romarin	5
Figure 2. Formation et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de H+	9
Figure 3 : Œufs de <i>Culex pipiens</i>	10
Figure 4: Larve de <i>Culex pipiens</i>	11
Figure 5: Nymphe de <i>Culex pipiens</i>	12
Figure 6: Morphologie générale d'un imago de <i>Culex pipiens</i>	13
figure.7 : Cycle de <i>Culex pipiens</i>	14
Figure 8 : Acide rosmarinique	17
Figure 9 : Gîte larvaires de moustiques	18
Figure 10: Méthode d'identification des larves de <i>Culex pipiens</i>	20
Figure 11: Critères d'identification des larves de <i>Culex pipiens</i>	21
Figure 12: Produit de synthèse 'spinosad'.	22
Figure 13 : Application des traitements (huile essentielle, formulation liquide, produit de synthèse)	23
Figure 14: Méthodes d'étude de l'effet antioxydant des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> et <i>Rosmarinus tournefortii</i> issues de différents modes culturaux	26
Figure 15: Variation des mortalités observées selon le facteur dose d'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus officinalis</i> sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosad	28
Figure 16 : Variation des mortalités corrigées selon le facteur dose des huiles essentielles formulées de <i>Rosmarinus officinalis</i> sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosad.	29
Figure 17: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de <i>Culex pipiens</i> sous l'effet de l'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus officinalis</i> traité par lombricompost solide et du Spinosad.	30
Figure 18: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de <i>Culex pipiens</i> sous l'effet de l'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus officinalis</i> traité par lombricompost liquide et du Spinosad.	31
Figure 19: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de <i>Culex pipiens</i> sous l'effet de l'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus officinalis</i> non traité (témoin) et du Spinosad .	32
Figure 20: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de <i>Culex pipiens</i> sous l'effet de l'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus officinalis</i> traité par l'eau de ville et du Spinosad .	33

Figure 21: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de <i>Culex pipiens</i> sous l'effet de l'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus</i> traité par le sel (NaCl) et du Spinosad.	<b>34</b>
	<b>35</b>
Figure 22: Variation des mortalités observées selon le facteur dose d'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus officinalis</i> sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosad.	
Figure 23 : Variation des mortalités corrigées selon le facteur dose des huiles essentielles formulées de <i>Rosmarinus tournefortii</i> sous l'effet de différents stimulateurs et du 'Spinosad'	<b>36</b>
Figure 24: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de <i>Culex pipiens</i> sous l'effet de l'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus tournefortii</i> traité par lombricompost solide et du Spinosad	<b>37</b>
Figure 25: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de <i>Culex pipiens</i> sous l'effet de l'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus tournefortii</i> traité par lombricompost liquide et du Spinosad	<b>38</b>
Figure 26: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de <i>Culex pipiens</i> sous l'effet de l'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus tournefortii</i> traité non traité (témoin) et du Spinosad	<b>39</b>
Figure 27: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de <i>Culex pipiens</i> sous l'effet de l'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus tournefortii</i> traité par l'eau et du Spinosad .	<b>40</b>
Figure 28: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de <i>Culex pipiens</i> sous l'effet de l'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus tournefortii</i> traité par le NaCl du Spinosad .	<b>41</b>
Figure 29 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par la vitamine C et Détermination de la valeur IC50.	<b>42</b>
Figure 30 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par les huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> et détermination de la valeur IC50.	<b>43</b>
Figure 31 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par les huiles essentielles de <i>Rosmarinus tournefortii</i> et détermination de la valeur IC50 .	<b>44</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif de la composition chimique des différents chémotypes d'huile essentielle de *Rosmarinus*.

18

## LISTE D'ABREVIATION

HE : huile essentielle.

RO : *Rosmarinus officinalis*.

RT : *Rosmarinus tournefortii*.

*cx. Pipines :culex pipines*

O.M.S :l'Organisation Mondiale de la Santé.

NCI : Le National cancer institue.

% : pourcentage.

MHz :million d'hertz.

W : Watts.

°C : DegréCelsius.

KOH : solution de potasse.

CO<sub>2</sub> : le dioxyde de carbone.

O<sub>2</sub> : L'oxygène.

NO : Monoxyde d'azote.

T : Température.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

SOD : la super oxyde dismutase.

D: Dose.

DPPH :diphényl-picrylhydrazyle.

Vit C : Vitamine C.

A.C.P :Analyse en composante principale.

Tem : Témoin.

tem- : Témoinnégatif.

.tem+ : Témoin positif.

PROD SYNT : Produit de synthèse 'Spinosad .

IC<sub>50</sub> : La concentration inhibitrice médiane.

REMERCIEMENT

DEDICACE

RESUME

ABSTRACT

ملخص

LISTE DES FIGURES ET GRAPHIQUES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE D'ABREVIATION

INTRODUCTION GENERALE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>CHAPITRE1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>3</b>
1-les substances bioactives d'origine végétale	3
1.1. Les huiles essentielles	3
1.1.1. Définition et localisation	3
1.1.2. Rôle des huiles essentielles dans la nature	4
1.1.3. Composition des huiles essentielles	5
1.1.4. Mécanismes d'action des huiles essentielles	6
1.1.4.1. Activité antioxydante	6
1.1.4.2. Les différents types de radicaux libres	7
1.1.4.2.1. Les radicaux libres	7
1.1.4.3. Origine et production des espèces réactives oxygénées	7
1.1.4.4. Dommages oxydatifs des radicaux libres	8
1.1.4.5. Moyens de défense contre les radicaux libres	8
1.1.4.6. Méthodes d'évaluation in vitro des propriétés antioxydants	8
1.1.5. Activité anti vecteur des huiles essentielles	10
1.1.5.1. Généralités sur le moustique urbain <i>Culex pipiens</i> nuisible de domaine de l'hygiène publique	10
1.1.5.2. Position systématique de <i>Culex pipiens</i>	13
1.1.5.3. Cycle de vie et nuisances	13
1.1.5.4. Principales nuisances causées par <i>Culex pipien</i>	14
2 .Investigation des caractéristiques des plantes modèles	15
2.1- Présentation du modèle végétal genre <i>Rosmarinus</i>	15
2.2. Systématique et description <b>botanique</b> du genre <i>Rosmarinus</i>	15
2.3 .Description botanique et répartition géographique du romarin	16
2.5. Utilisations traditionnelles et effets thérapeutiques du romarin	16
2.6. Chimio taxonomie du genre <i>Rosmarinus</i>	17
<b>CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES</b>	<b>19</b>

2. Matériel et méthodes	19
2.1. Matériel biologique.	19
2.1.1. Matériel végétale.	19
2.1.2. Matériel animal.	19
2.2. Méthodes d'étude de l'activité larvicide des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> et <i>Rosmarinus tournefortii</i> sous l'effet des différents stimulateurs.	19
2.2.1. Méthode d'échantillonnage.	19
2.2.2. Identification des larves de <i>Culex pipiens</i> .	20
2.2.4. Formulation des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> et <i>Rosmarinus tournefortii</i> .	21
2.2.5. Dilutions des huiles essentielles formulées et présentation du témoin positif.	21
2.2.6. Comparaison l'effet des différentes phytopréparation a base de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> et <i>Rosmarinus tournefortii</i> à un produit de synthèse "Spinosed".	22
2.2.6.1. Présentation du Spinosed	22
2.2.6.2. Dilution du Spinosed	22
2.2.7. Application des traitements	23
2.2.8. Estimation du taux de mortalité	23
2.2.8.1. Calcul du pourcentage de la mortalité observée	24
2.2.8.2. Estimation de la mortalité corrigée	24
2.3. Méthodes d'étude de l'effet antioxydant des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> et <i>Rosmarinus tournefortii</i> issues de différents modes culturaux.	24
2.3.1. Technique	25
2.3.2. Détermination du pourcentage d'inhibition IC50	26
3. Analyses statistiques des données	26
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION</b>	27
1.1. Etude comparée de l'activité larvicide de l'huile essentielle formulée de <i>Rosmarinus officinalis</i> sous l'effet de différent stimulateur et du Spinosed sur L4 de <i>Culex pipiens</i> .	27
1.2. Estimation de la mortalités corrigées des huiles essentielles formulées de <i>Rosmarinus officinalis</i> sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosed sur L4 de <i>Culex pipiens</i> .	28
1.3. Evolution temporelle de la mortalité observée des huiles essentielles formulées de <i>Rosmarinus officinalis</i> sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosed sur L4 de <i>Culex pipiens</i> .	30
2.1. Etude comparée de l'activité larvicide d'huile essentielle formulée de	34

<i>Rosmarinustournefortii</i> sous l'effet de différents stimulateur et du Spinosed sur L4 de <i>Culex pipiens</i> .	
2.2 .Estimation de la mortalités corrigées des huiles essentielles formulées de <i>Rosmarinustournefortii</i> sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosed sur L4 de <i>Culex pipiens</i> .	35
2.3 .Evolution temporelle de la mortalité observée des huiles essentielles formulées de <i>Rosmarinustournefortii</i> sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosed sur L4 de <i>Culex pipiens</i> .	37
2 .Effet antioxydant des huiles essentielles de <i>Rosmarinusofficinalis</i> et <i>Rosmarinustournefortii</i> sous l'effet de différents stimulateurs.	41
2 .1 . Pourcentage d'inhibition de DPPH par la vitamine C et les huiles essentielles testées et détermination de la valeur IC50.	41
2.1.1. Pourcentage d'inhibition de DPPH par la vitamine C et détermination de la valeur IC50.	42
2.1.2. Pourcentage d'inhibition de DPPH par les huiles essentielles de <i>Rosmarinusofficinalis</i> et détermination de la valeur IC50.	42
2.1.3. Pourcentage d'inhibition de DPPH par les huiles essentielles de <i>Rosmarinustournefortii</i> et détermination de la valeur IC50.	42
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	45
1. Potentialité larvicide d'une formulation à base d'huile essentielle de <i>Rosmarinusofficinalis</i> et <i>Rosmarinustournefortii</i> issue de différents modes culturaux à l'égard des larves L4 de <i>Culex pipiens</i> .	45
2. L'activité antioxydante des huiles essentielles de <i>Rosmarinusofficinalis</i> et <i>Rosmarinustournefortii</i> sous l'effet de différents stimulateurs.	47
<b>Conclusion</b>	51
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	52

# INTRODUCTION GENERALE

## INTRODUCTION GENERALE

Les plantes produisent naturellement des substances actives comme les huiles essentielles, permettant ainsi de se protéger des insectes, des maladies ou d'attaques extérieures. Les huiles essentielles sont par définition des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages (**Cseke et Kaufman**, 1992).

Les plantes aromatiques sont utilisées comme tous les végétaux en médecine, en Parfumerie, en cosmétique et pour l'aromatisation culinaire. Elles font partie de notre quotidien sans que nous le sachions.

Il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action, bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés tels que les alcaloïdes des terpènes, Stéroïdes et des composés poly phénoliques.

Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus principes actifs des plantes. L'aromathérapie, l'art de soigner par les huiles essentielles, est devenue une science méthodique depuis qu'elle repose sur une classification de ces huiles selon leur capacité à lutter contre les bactéries (**Collectif**, 2001).

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus (**Collectif**, 2001). Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes et antimicrobiennes comme les vitamines, les caroténoïdes et les poly phénols récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme sources d'antioxydants (**Athamena**, 2009).

Les radicaux libres sont des substances produites par le métabolisme cellulaire qui peuvent être toxiques pour les tissus biologiques et source de lésions de l'ADN, des lipides, des membranes cellulaires et des protéines (**Christen**, 2000).

Dans la région semi-aride, la faune culicidienne a fait l'objet d'un nombre de travaux qui s'intéressent plus particulièrement à la systématique, la biochimie, la morphométrie, la lutte chimique et biologique à l'égard des moustiques, (**Aissaoui et Hamaidia**, 2004).

Les diptères du genre *Culex* sont des agents de l'homme et des animaux, tel est le cas du virus du Nil occidental et de la fièvre hémorragique de la vallée du Rift (flavivirus), en Afrique (**Gargan**, 2008 ; **Krida et al.**, 2011 ; **Reusken et al.**, 2011).

*Culex pipiens* L. 1758 est parmi les espèces de moustique les plus répandues et les plus nuisibles dans le monde. **Savage et Miller** (1995) considèrent *Culex pipiens* comme l'un des principaux vecteurs du virus de la encéphalite aux Etats-Unis. Il a été constaté aussi

## INTRODUCTION GENERALE

comme le principal responsable de L'épidémie du virus West Nile qui a frappé ce pays en 2002 (**palmisano et al.**, 2005). En 2011, 712, 110 et 303 cas ont été déclarés respectivement aux USA, au Canada ainsi qu'en Europe (**Amraoui**, 2012).

Dans cet ordre de réflexion notre objectif consiste à étudier les potentialités larvicide à l'égard des formes larvaires du moustique *Culex pipiens* et l'activité antioxydante des huiles essentielles de deux espèces du romarin (*Rosmarinus Officinalis* et *Rosmarinus Tournefortii*) issue de différents modes culturaux (application de lambriscompost solide, application de lambriscompost liquide, application d'une solution saline avec 25 ml/mol et application de l'eau de ville).

Alors, on peut proposer la problématique suivante : <<A ce que notre huile essentielle est efficace ou pas pour les deux activités (l'activité anti-moustique et l'activité antioxydante)?>>.

### CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

#### 1-les substances bioactives d'origine végétale

Les substances bioactives sont des molécules tirées d'une source naturelle biologique (animale ou végétale), ayant des propriétés physico-chimiques bénéfiques (anti-tumorales, antivirales, antifongiques, antimicrobiennes, anti oxydantes, cicatrisantes...) offrant un large champ d'application : cosmétiques, pharmaceutiques, additifs nutritionnels, compléments alimentaires...etc.

Le National cancer institue (NCI), créé en 1937 aux États-Unis, inaugure en 1955 le CCNSC (Cancer chemotherapy national service center) afin de coordonner les travaux de recherche d'équipes académiques et de l'industrie pharmaceutique sur les produits naturels destinés à la lutte contre le cancer. Ces collaborations donnent naissance à des programmes de grande ampleur, tout d'abord sur les produits de fermentation et quelques plantes (de 1957 à 1960, 1 500 extraits de plantes sont analysés à la recherche d'une activité antitumorale). Les découvertes de la podophyllotoxine (*Podophyllumpeltatum*) et des vinca-alcaloïdes (*Catharanthusroseus*) stimulent les recherches sur les plantes, et plus de 114 000 extraits de 35 000 plantes sont passés au crible entre 1960 et 1982 (**Cragg et al.**,1993).

Cet engouement pour les plantes et microorganismes terrestres n'empêche pas Petit de lancer, en 1965, le premier programme sur la recherche de composés anti tumoraux issus d'organismes marins, avec le soutien du NCI, en particulier de Hartwell (1906-1991) et de Wood (1919-2002) (**Storad**, 1990).

A flore mondiale comprend environ 390 800 espèces, dont les angiospermes constituent la végétation terrestre la plus notable et pourraient compter 352 000 espèces (**Abraham, et al .**, 2012). Plus de 2 000 000 d'espèces marines restent encore à explorer. Jusqu'à présent, moins de 10 % des plantes supérieures (**Scimecaet Tetau**, 2005) et moins de 0,5 % des organismes marins ont été étudiés en termes de recherche de substances potentiellement thérapeutiques , Ainsi, la majorité des molécules bioactives issues du monde animal et végétal restent encore à découvrir (**Scimecaet Tetau**, 2005).

#### 1.1. Les huiles essentielles

##### 1.1.1. Définition et localisation

**Définitions des huiles essentielles (HE) :** Il y a plusieurs définitions disponibles de l'huile essentielle convergente sur le fait que les huiles essentielles, le terme « huile » s'explique par la propriété de solubilisation des composés dans les grasses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « Essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (**Khefifi**, 2015).

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La pharmacopée européenne définit les huiles essentielles comme « Produit odorant, généralement de composition complexes, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement de la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique entraînant pas de changement significatif de sa composition » (**Herreroal.**, 1996).

Selon Afnor, l'huile essentielle aussi appelée « essence ». C'est une substance aromatique naturelle. Les huiles essentielles sont des substances de consistances huileuses, plus au moins fluides, très odorantes, volatile et très rarement colorés. Elles sont plus légères que l'eau, solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques, mais insoluble dans l'eau (**Anonyme**, 2021).

### **Localisation des huiles essentielles (HE) :**

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles: Conifères, Rutaceae, Ombellifères, Myrtaceae, Lamiaceae, Annonaceae. Tous les organes peuvent en renfermer: les sommités fleuries, les racines ou rhizomes, les écorces, les fleurs, le bois, les fruits, les grains. A noter que dans la même espèce, on peut rencontrer les huiles essentielles simultanément dans des organes différents et que la composition de celle-ci peut varier d'un organe à l'autre. En outre, cette composition peut varier dans une même espèce selon les conditions climatiques et édaphiques du lieu de récolte. Le plus souvent, en climat chaud, la teneur en huile essentielle est plus élevée. Dans l'organe de la plante, les huiles essentielles peuvent se former dans des cellules non différenciées ou plus grosses (Lauranceae, Magnolaceae). Généralement, elles sont localisées dans des organes sécréteurs, variables suivant les familles botaniques : Poils de Lamiaceae et des composés : l'huile essentielle s'accumule sous la cuticule, poche sécrétrice schizogène des Myrtaceae, résultant de la division répétée d'une cellule et de l'écartement des cellules filles laissant. Un méat où s'accumule l'essence, poche schizogène (Rutaceae) où il y a d'abord formation d'un méat, puis lyse d'une partie du tissu sécréteur de bordure, canaux sécréteurs (Conifères, Térébinthaceae). On désigne par essence, les produits odorants non préformés chez le végétal, mais provenant de l'hydrolyse enzymatique d'hétérosides (essence d'amandes amères, essence sulfurées des crucifères) (**Clément et Engonga**, 2009).

### **1.1.2. Rôle des huiles essentielles dans la nature**

Les huiles essentielles ont certainement un rôle dans la plante, il s'agit d'une sécrétion qui induit une augmentation de la production de certains composants pour inhiber la germination en hiver, protéger la plante contre les parasites, les insectes et les herbivores et favoriser la fécondation en attirant certains insectes (**Milpied**, 2009).

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1.3. Composition des huiles essentielles

Huile essentielle : Représente 1 à 3% de la plante, sa composition ainsi que la concentration dépend fortement des chémotypes. Cependant en termes de nature des composés, les études effectuées sur de nombreux échantillons d'huiles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* ne montrent aucune différence notable. En effet ses principaux constituants peuvent être le 1,8-cinéole, l' $\alpha$ -pinène, camphor, borneol, de l'acétate de bornyl, de la verbénone, du p-cymène ou du myrcène; ils peuvent être accompagnés de  $\beta$ -caryophyllène, de limonène, de linalool, de  $\beta$ -pinène, de sabinène, de  $\gamma$ -terpinène, d' $\alpha$ -terpinéol et de terpinene-4-ol (Teuscher *et al.*, 2005).

1. Phénols diterpiniques: constitués principalement d'acide carnosolique (environ 0,35%) qui se dégrade facilement en carnosol, et est accompagné d'isorosmanol, de rosmariquinone de rosmaridiphénol.
1. Dérivés de l'acide cinnamique (tannins): représentent environ 3,5% et sont constitués principalement d'acide rosmarinique (1,1 à 2,5%).
1. Flavonoïdes : présents sous forme d'aglycones et d'hétérosides comme la cirsimarine, la diosmine, l'hespéridine, l'homoplantiginine (Figure :1) (Manach *et al.*, 2004).

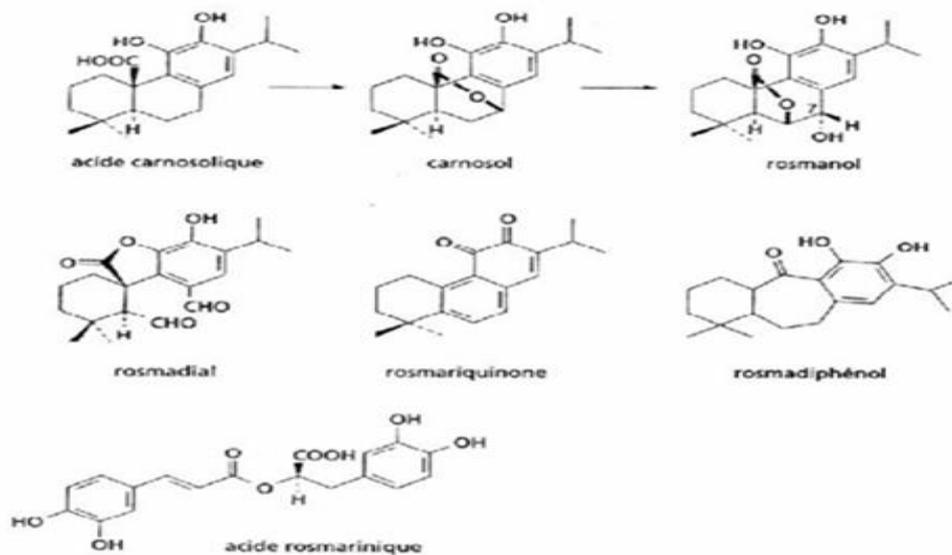


Figure 1 : Composés phénoliques caractéristiques des extraits du *Rosmarin* (Manach *et al.*, 2004).

# CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1.1.4. Mécanismes d'action des huiles essentielles

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci, un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques, cas de dérivés du phénol. En plus leurs radicaux intermédiaires ne sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents déterminés capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur (Berset et Cervelier, 1996).

### 1.1.4.1. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des substances dont la fourniture est obligatoire pour l'organisme. Un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la capacité de défense des antioxydants conduit au stress oxydant ou stress oxydatif. Ce dernier a des effets néfastes sur la santé de la population générale et de certains groupes de patients avec des maladies chroniques et aiguës, que certains micronutriments et habitudes alimentaires peuvent moduler (Berger, 2006).

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défense antioxydante, enzymatique (super-oxydes dismutases SOD, catalases, glutathion peroxydases, glutathion réductases) et non-enzymatique (vitamines A, C et E, certains minéraux comme le zinc et le sélénium et d'autres molécules telles que l'albumine, l'acide urique, sulfhydryles et la bilirubine), localisé dans les compartiments intra et extracellulaire. Ce système de défense permet de neutraliser les ROS de plusieurs manières. Alors, les antioxydants jouent un rôle d'enzymes protectrices dont la production est stimulée par l'entraînement en endurance et de vitesse selon un mécanisme d'adaptation, en raison de cet engouement scientifique, les impératifs technologiques et économiques des industries pharmaceutiques et alimentaires ont développé considérablement l'emploi d'agents antioxydants (Basuet *al.*, 2013).

#### Définition :

Un antioxydant est défini comme étant substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques, Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Boyd, 2003).

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La raison pour laquelle les antioxydants sont importants vient du fait que l'oxygène est un élément potentiellement toxique puisqu'il peut être transformé en formes plus réactives telles que le super oxyde, le peroxyde d'hydrogène actif. Ils agissent en formant des produits finis non radicalaires, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour le transformer en chaleur. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (Pincemail et al., 1998).

### 1.1.4.2. Les différents types de radicaux libres

**Définition :** Les radicaux libres sont des substances produites par le métabolisme cellulaire qui peuvent être toxiques pour les tissus biologiques et source de lésions de l'ADN, des lipides, des membranes cellulaires et des protéines. Des systèmes protecteurs efficaces contrôlent leurs effets délétères au sein de la cellule. Ces systèmes reposent en particulier sur trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase. Au niveau cérébral, la SOD et la glutathion peroxydase jouent un rôle majeur, tandis que la catalase a une faible activité. Un défaut d'équilibre entre la production de radicaux libres et les mécanismes de défense constitue un stress oxydant (Lobo, 2010).

#### 1.1.4.2.1. Les radicaux libres

L'anion superoxyde : la molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde, cet anion intervient comme facteur dans de nombreuses réactions.

1. Le radical hydroxyde : OH<sup>-</sup>, il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.
2. Acétyl choline estérase ;
3. Le radical peroxyde : ROO<sup>-</sup>

L'oxygène singlet : O<sub>2</sub>, forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité (Hadi, 2004).

### 1.1.4.3. Origine et production des espèces réactives oxygénées

#### Origine des espèces réactives oxygénées :

Origine des radicaux libres Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée, et L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

directement par les cellules phagocytaires activées. Le monoxyde d'azote, est produit par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthétase, à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou macrophages, et on a Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox qui se produisent dans l'organisme, l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome (**Favier**, 2003).

### **Production des espèces réactives oxygénées :**

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car, ils sont utiles pour l'organisme à doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » (**Favier**, 2003).

#### **1.1.4.4. Dommages oxydatifs des radicaux libres**

Les dommages causés aux cellules par les radicaux libres jouent un rôle central dans le processus de vieillissement et dans la progression de nombreuses pathologies chroniques tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire. Les dommages oxydatifs se produisent lorsque les molécules qui manquent d'électrons (radicaux libres) volent les électrons nécessaires à partir des cellules. Pour que ces cellules fonctionnent, elles volent ensuite des électrons à d'autres cellules, et une chaîne de dommage cellulaires est initiée (**Yadav et al** .,2016).Les antioxydants réparent les dommages en faisant don d'électrons qui seraient autrement volés par les molécules de radicaux libres. Ils arrêtent l'effet domino de la dégradation cellulaire et empêchent ainsi les dommages de la peau et les dommages aux organes internes et aux tissus, et Il peut être plus difficile de les obtenir à partir d'herbes et d'épices. C'est pourquoi les huiles essentielles sont une excellente source d'antioxydants. Leurs formulations hautement concentrées donnent l'équivalent d'une plaque complète de leur matériau d'origine.(**Wallig et Klein**, 2002).

#### **1.1.4.5. Moyens de défense contre les radicaux libres**

Lors d'un stress oxydant, les ROS non détoxifiés par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules directement à leur contact, contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'ADN (**Koechlin et Ramonatoxo**, 2006).

#### **1.1.4.6. Méthodes d'évaluation invitrodes propriétés antioxydants**

Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un produit pur ou de mélanges ont été examinées et regroupées selon leurs principes. Elles sont fondées sur la détermination de produits résultant de l'oxydation ou, au contraire, mesurent l'efficacité

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

d'une substance à piéger des radicaux, souvent en donnant une forme  $H\cdot$ . Parmi les méthodes d'évaluation, celles comparant l'aptitude du produit à celle du Trolox (la méthode TEAC en particulier) sont intéressantes. En effet, elles mesurent directement la réactivité d'un composé donneur de  $H\cdot$ , sans examen d'un produit de dégradation. L'examen au laboratoire de la méthode du TEAC a montré qu'elle était applicable dans différents solvants (diméthylsulfoxyde, méthanol, éthanol ou tampon phosphate) quelle qu'en soit l'hydrophilie ou l'hydrophobie. La méthode automatisée ORAC diffère de celle du TEAC et du DPPH, en évaluant l'activité antioxydante de manière dynamique avec des radicaux actifs sur le plan pathologique. Disposant de méthodes d'évaluations diversifiées il devient possible, d'une part, de suivre l'évolution des substances naturelles présentes dans les matières premières jouant un rôle d'antioxydant et éventuellement d'envisager un enrichissement pour atteindre l'objectif qualitatif souhaité et, d'autre part, de tester comme conservateurs différentes molécules employées pour d'autres usages (colorants alimentaires par exemple). Dans ces conditions « l'adjuvance antioxydative », fruit d'une collaboration entre technologues et nutritionnistes, peut devenir beaucoup plus précise, tout en étant aussi efficace à moindre risque, à défaut de disposer d'une électrode électrochimique accédant directement au niveau et à l'importance de la protection contre l'oxydation, les différentes méthodes présentées permettent, en fonction des milieux alimentaires étudiés, une évaluation optimale et ciblée du potentiel antioxydant. Elles sont complémentaires les unes des autres, sans que l'une puisse être établie en tant que référence fondamentale (Prior, et Cao, 1999).

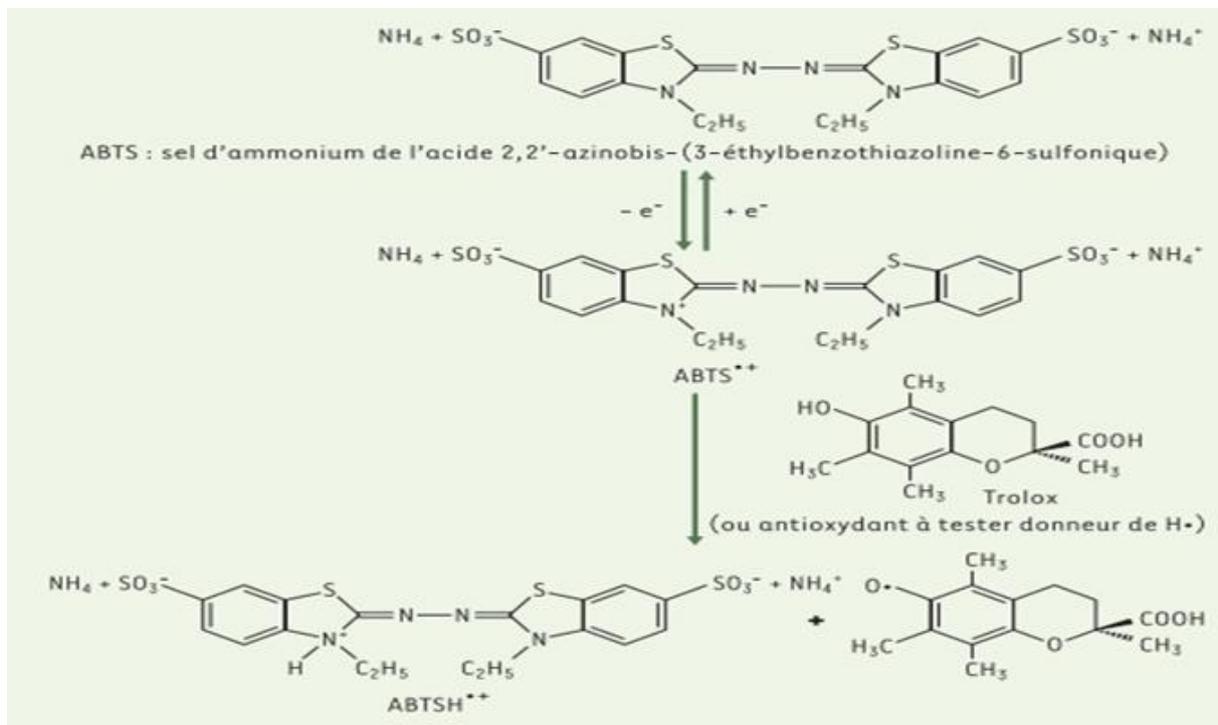


Figure 2. Formation et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de  $H\cdot$  (Lienet *al.*, 1999).

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1.5. Activité anti vecteur des huiles essentielles

#### 1.1.5.1. Généralités sur le moustique urbain *Culex pipiens* nuisible de domaine de l'hygiène publique

##### 1. Présentation de *Culex pipiens*

Ce sont des insectes Ptérygotes holométaboles. Leur corps est élancé possédant de longues antennes et des pattes fines et longues. Seules les femelles sont hématophages. La famille des culicidés dont fait partie *Culex pipiens* se caractérise par des ailes recouvertes d'écailles. La trompe des adultes est d'une taille égale à celle de la tête et du thorax combinés (Rioux, 1958).

**Caractères morphologiques des différents stades :** Comme tout insecte à métamorphose complète (holométabole), le développement du moustique se caractérise par quatre stades: Œuf, larve, nymphe et adulte.

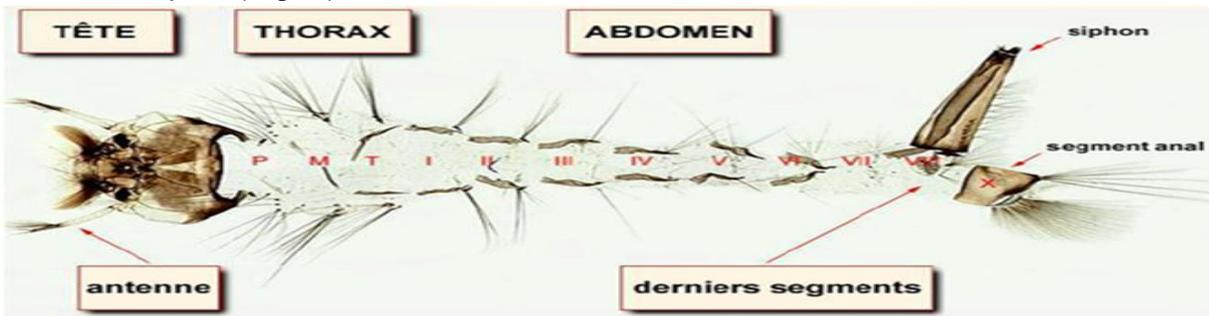
**Les œufs :** Les œufs sont pondus habituellement à la surface de l'eau, soit isolément (genres *Aedes* et *Anopheles*), soit regroupés dans des masses ayant la forme de nacelle (genres *Culex*, *Culiseta*, *Uranotaenia*, *Orthopodomyia* et *Mansonia*), ils peuvent être déposés sur substrats humides (*Aedes*) qui peuvent éclore après une période de dessiccation. Les œufs flottent à la surface de l'eau soit du fait des phénomènes de tension superficielle, soit grâce à la présence de flotteurs latéraux (*Anopheles*) ou apicaux (*Culex*). La variation de forme, de taille et de coloration a parfois été utilisée en taxonomie. (Schaffner *et al.*, 2001). Ils sont blancs au début mais virent au noir ou au brun au bout de 12 à 24 heures la durée d'incubation des œufs est généralement de 2 à 3 jours mais dépend de la température (OMS, 2015) (Fig. 3). Les œufs ne donnent pas de larves au glacier (Gashen, 1932) mais aussi n'éclosent pas lorsque la température monte à plus de 30°C.



Figure 3 : Œufs de *Culex pipiens* (Aouati, 2009).

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**La Larve:** Le développement larvaire des Culicidae comporte quatre stades de morphologie comparable, hormis la taille (de 1 à 1,5 cm). La durée du stade larvaire dépend de la température et dure cinq à huit jours (**Balenghien**, 2006). Les caractères morphologiques utiles en systématique concernent le quatrième stade. La tête de la larve des moustiques a fait l'objet de très nombreux travaux, (**Cook**, 1974). Elle est formée par une plaque chitineuse médiane : le fronctoclypéus et deux latérales (plaques épicroaniennes). Au fronctoclypéus est rattachée une plaque antérieure étroite (préclypéus) portant des brosses buccales. Les pièces buccales sont du type broyeur. Les plaques chitineuses (préclypéus et fronctoclypéus) portent des soies symétriques (soies préclypéables, clypéables, frontales, occipitales...). Latéralement on distingue deux tâches oculaires ainsi que les deux antennes qui ont un aspect variable suivant les groupes, spiculées sur toute la longueur chez les Anophelinés mais portant toujours des soies caractéristiques (Fig. 4).



**Figure 4 : Larve de Culex de pipiens (Bruhnes et al., 1999).**

Le thorax représenté par une masse indivisée de forme légèrement globuleuse, large aplatie dorso-ventralement, est formé de trois segments soudés (Prothorax, mésothorax et métathorax), dont la distinction se fait à l'aide de la chétotaxie. L'abdomen de la larve de moustique possède dix segments : huit segments bien apparents, le neuvième pas évident, soudé au huitième, et un dixième segment forme le segment anal. Chez les Culicidés et les Toxorhynchitidés l'extrémité apicale est munie d'un organe médian, chitinisé, de forme tronconique appelé siphon respiratoire. La longueur et la largeur sont caractéristiques de l'espèce (indice siphonique, c'est le rapport de la longueur / largeur à la base, qui varie de 1 à 15) ce dernier porte latéralement une rangée d'épines appelée peigne du siphon et une ou plusieurs touffes de soies. Le dixième segment est le segment anal, il porte quatre longues papilles annales (lobes annaux), une brosse ventrale et des soies caudales internes et externes, sa partie tergale compte un sclérite en selle (**Snodgrass**, 1959).

**La Nympe :** La tête et le thorax chez la nympe du moustique forment un volumineux céphalothorax, qui fait suite à un abdomen étroit muni de deux palettes natatoires transparentes (**Rodhain et Perez**, 1985) Elle est recourbée de forme générale en virgule ou en point d'interrogation (Fig. 5). La nympe ne se nourrit plus, elle respire à l'aide de deux trempettes respiratoire situées sur le céphalothorax (**Guillermet**, 2013).

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



**Figure 5 : Nympe de *Culex pipiens* (Balenghien, 2006).**

La cuticule du cephalothorax est transparente ou, on voit la majorité des éléments nymphaux, et les distinctions taxonomiques des nymphes sont fondées sur les caractères des trompettes respiratoires, la chétotaxie et les caractères des nageoires (Séguy, 1923).

**L'adulte** : Une fois métamorphosé, provoque une cassure au niveau de la tête nymphale et émerge à la surface de l'eau. Les mâles atteignent leur maturité sexuelle au bout d'un jour alors que les femelles l'atteignent au bout de 1 à 2 jours, et elles sont plus grandes que les mâles issus d'une même émergence (Clements, 1999).

Les moustiques, comme beaucoup d'insectes se nourrissent de nectar, source d'énergie. Seules les femelles sont hématophages, elles n'ont pas besoin de sang pour leur propre survie mais en retirent les protéines nécessaires à la maturation de leurs œufs. La fécondation des œufs s'effectue lors de la ponte grâce au stockage du sperme des mâles par la femelle dans une spermathèque. En général, la durée de vie des moustiques adultes varie d'une semaine à plus d'une trentaine de jours. Deux éléments permettent de distinguer le mâle de la femelle à l'œil nu; les palpes maxillaires sont très courts et effilés chez la femelle, contrairement au mâle où ils sont plus longs que la trompe et ses antennes sont plus développées et très poilues (Euzéby, 2008). Les trois parties fondamentales du corps du Moustique sont bien distinctes : La tête de forme générale globuleuse, elle porte : des yeux à facettes, volumineux et presque jointifs (séparés par une bande frontale étroite) souvent de couleur bleue ou vert métallique ; une paire d'antennes à quinze segments, plumeuses chez le mâle, presque glabres chez la femelle (Brunhes, 1970). Les appendices buccaux sont de type piqueur-suceur. Le thorax est formé de trois segments soudés : le prothorax, le mésothorax et le métathorax, chacun portant une paire de pattes. Le mésothorax et le métathorax portent respectivement les ailes fonctionnelles et les balanciers (deuxième paire d'ailes modifiées). La chétotaxie thoracique, surtout les soies pleurales (spiraculaires, postspiraculaires, stérno-pleurales, préalaires...), ont un grand intérêt systématique. L'abdomen mince et allongé, composé de dix segments dont les neuvième et dixième formant les génitalia (ou hypopygium) assurant les fonctions sexuelles (Fig. 6) (Bendali, 2006).

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

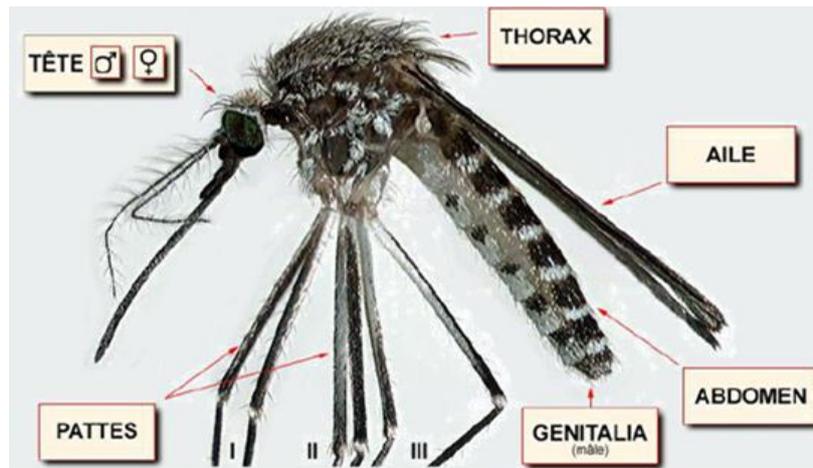


Figure 6 : Morphologie générale d'un imago de *Culex pipiens*(Cachereul, 1997).

### 1.1.5.2. Position systématique de *Culex pipiens*

Les moustiques sont des insectes appartenant à la classe des Insectes de l'embranchement des arthropodes. Ils possèdent trois paires d'appendices locomoteurs. Ils appartiennent à l'ordre des Diptères, qui comme leur nom l'indique regroupe des insectes qui ne possèdent qu'une paire d'aile méso thoracique; les ailes méso thoraciques sont transformées en haltères (ou balanciers). La famille des Culicidés dont fait partie le genre *Culex* comprend environ trois mille espèces (**Knight et Stone 1977**).

La position systématique prise en considération actuellement est celle émise par **Linné**(1758) qui classe *Culex* comme suit:

Règne: Animalia

Embranchement : Arthropoda

Sous-embranchement: Antennata

Classe: Insecta

Sous-classe: Pterygota

Ordre: Diptera

Sous-ordre: Nematocera

Famille: Culicidae

Sous-famille: Culicinae

Genre: *Culex*

Espèce: *Culex pipiens*

### 1.1.6.3. Cycle de vie et nuisances

**Cycle de vie** : Les moustiques sont des insectes à métamorphose complète, c'est-à-dire que les larves sont très différentes des adultes. Contrairement à la femelle, le mâle ne prend pas de repas sanguin, indispensable à cette dernière pour porter ses œufs à maturité. Cela lui est possible grâce à des pièces buccales adaptées (cf. morphologie). Les œufs sont pondus dans l'eau, claire en général, mais on en trouve également dans les eaux polluées, avec des matières organiques qui permettront aux larves de se nourrir (fig.7). Ils sont déposés en paquets formant une nacelle qui flotte sur l'eau. Cette nacelle mesure 3-4 mm de long et 2-3 mm de large. L'éclosion se produit environ 24h à 48h après l'oviposition (**Kettle, 1995**).

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

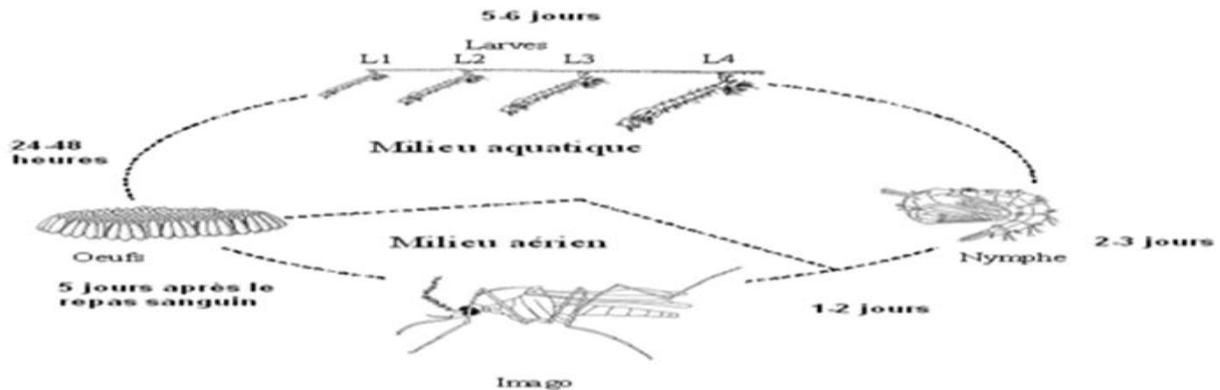


Figure 7 : Cycle de *Culex pipiens* (Candaceet *al.*, 2001).

### 1.1.6.4. Principales nuisances causées par *Culex pipiens*

On distingue deux types de nuisances causées par *Culex pipiens* :

La première nuisance est causée par la pique de la femelle qui va entraîner, chez l'homme comme chez l'animal, une lésion ronde érythémateuse de quelques mm à deux cm de diamètre. Il est à noter que la pique ne provoque aucune douleur immédiate grâce à un anesthésique local contenu dans la salive (Andreo, 2003). Les lésions sont très souvent suivies d'une réaction allergique due aux allergènes présents dans la salive de *Culex pipiens* injectée durant le repas sanguin. Cela entraîne généralement un fort prurit (Toral et Caro, 2008).

La deuxième nuisance est liée à la transmission de maladies. Le moustique se contamine au cours du repas sanguin sur un hôte infecté. L'agent pathogène va alors subir un cycle de maturation et sera transmis au cours du repas suivant sanguin, dont l'agent pathogène accomplit une période de son développement chez le moustique.

On distingue deux types d'agents pathogènes transmis par les *Culex* :

**Virus**, de la famille des *Bunyaviridae* genre *Phlebovirus*, responsable de la maladie de la Fièvre de la Vallée du Rift, zoonose dont l'espèce cible principale est le bétail (Petit et *al.*, 2009). De la famille des *Flaviviridae* genre *Flavivirus* qui cause le West Nile, atteint les oiseaux mais peut aussi toucher l'homme (Faraj et *al.*, 2006). L'encéphalite de Saint Louis atteint également l'oiseau et l'homme. L'encéphalite japonaise humaine a pour réservoirs le porc et les oiseaux sauvages. Le virus de la dengue atteint exclusivement l'homme. La fièvre jaune peut se transmettre aux singes et à l'homme (Hamer et *al.*, 2008).

**Parasites**, *Dirofilaria immitis*, responsable de la dirofilariose cardio-pulmonaire du chien. D'autres espèces peuvent néanmoins être atteintes : le chat, les canidés sauvages et même l'homme (Toral et Caro, 2005). *Dirofilaria repens*, agent de la filariose sous-cutanée chez le chien, mais aussi chez le chat et l'homme. L'adulte se développe dans le tissu conjonctif sous-cutané. Cliniquement, des nodules de quelques millimètres à quelques centimètres de diamètre, indolores, prurigineux et localisés préférentiellement en région postérieure du corps (Euzéby, 2008).

# CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## 2 .Investigation des caractéristiques des plantes modèles

### 2.1- Présentation du modèle végétal genre *Rosmarinus*

Le nom «romarin» viendrait du latin «rosmarinus» (roséedemer) (Scheler,1862),ou grec «rhopsmyrinos» (buisson aromatique)ou encore du latin «rhusmarinus» (sumacdemer) (Rameauetal,2008).

On l'appelle également «herbe-aux-couronnes», et en provençal ,«encensier» et plusieurs appellations sont attribuées au *Rosmarinus* :

-**Les noms arabes:** klil,Hatssa,Loubon, hassalban.

-**Les noms berbères:** lazir, Aziir,Ouzbir,Touzala. (Beloued ,2001).

### 2.2. Systématique et description botanique du genre *Rosmarinus*

La classification botanique complète du genre *Rosmarinus* L. n'a été achevée qu'au début du 20e siècle en raison de l'extrême variabilité des espèces. Le romarin appartient à la deuxième série de la famille des labiées ou Lamiacées qui en compte six. Cette famille, l'une des plus importantes de la flore d'Algérie, compte plus de 200 genres et 3500 espèces (Boelens, 1985).

La systématique du romarin est la suivante (Quezel et Santa, 1963):

Règne : Plantae (végétal)

Phylum : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae (alt. Labiatae)

Genre : *Rosmarinus* .

Le genre *Rosmarinus*, du latin signifiant «rose de la mer», se présente sous forme d'un arbuste ou sous-arbrisseaux ligneux très odorant touffu, xérophyte, fortement rameux toujours vert, à racine pivotante et à tiges ligneuses, généralement érigées Feuilles linéaires à marge révolutée, gaufrées, verdâtres en dessus avec corolle bleue pâle ou blanchâtre à 2 lèvres, la supérieure entière ou à peine émarginée pas plus longue que l'inférieure, cette dernière trilobée. (Quezel et Santa, 1963).

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 2.3 .Description botanique et répartition géographique du romarin

#### Description botanique :

***Rosmarinus officinalis*** ,Arbrisseau qui peut atteindre 2m de hauteur. Cette espèce se distingue par une inflorescence et calice à pilosité pruinée très courte constituée par des poils étroitement appliqués. Inflorescences en épis très courts, à bractées squamiformes de 1-2 mm, rapidement caduques. (Quezel et Santa, 1963).

***Rosmarinus tournefortii*** : Dénommé également *Rosmarinus eriocalyx* et dont l'épithète signifie calices laineux, se réfère à la frappante couverture de poils dense. En effet cette espèce se distingue par une inflorescence et calice à pilosité double, l'une courte et visibles à l'œil nu, l'autre constituée par de longs poils dressés glanduleux au sommet. Inflorescences plus longues que chez *R. officinalis*, à bractées amples cordiformes, longues de 3-4 mm (Quezel et Santa, 1963).

De plus, *Rosmarinus tournefortii* possède des feuilles plus petites (5 à 15 mm de long et moins de 2 mm de large) avec des pédoncules floraux à poils denses. Cette espèce est également connue pour avoir une croissance lente avec des hauteurs généralement de 25cm et qui n'excèdent jamais 1m donnant ainsi à la plante un aspect prostré.

**Répartition géographique** :Le romarin possède une aire géographique très vaste, il pousse sur tous types de terrains avec une préférence pour les sols calcaires, argileux, argileux-limoneux, situé dans les endroits ensoleillés, chauds, secs et abrités du vent *Rosmarinus officinalis* est répandu sur la plupart des maquis, garrigues et rivages marins alors que le *Rosmarinus tournefortii* est plus apte à se développer sur les rocailles jusqu'à 1500m d'altitude. Il accompagne souvent le pin d'Alep, la sauge, le thym (Gilly, 2005). Le romarin officinal est spontané dans toute la région méditerranéenne (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, France, Espagne, Portugal, Grèce, Turquie et Italie). Cependant, étant donné qu'il est cultivé depuis l'antiquité, on le retrouve dans de nombreux pays d'Europe et d'Asie notamment l'Inde, les Philippines, les Antilles, l'Australie, les Etats-Unis et le Mexique (Pelikan, 1986) ; Contrairement au *R. officinalis*, le *R. tournefortii* est seulement répandu en Afrique du Nord et au sud de l'Espagne ou il est considéré comme endémique. En Algérie les différentes espèces de romarin s'étalent sur une superficie excédant 100 000 hectares (Bensebia et al., 2009) sur la bande littorale et hauts plateaux et est dénommé généralement "Klil" ou "M'zir" dans les régions Berbérophones. Le *Rosmarinus tournefortii* semble être plus rare dans les régions littorales et Atlas Tellien Algérois et Oranais ainsi que les hauts plateaux centre et ouest (Teuscher et al., 2005).

### 2.5. Utilisations traditionnelles et effets thérapeutiques du romarin

**traditionnelles** :L'Agence du médicament (ancien nom de l'actuelle Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé : ANSM) revendique en 1998, pour les sommités fleuries et les feuilles de Romarin, les indications thérapeutiques suivantes : traditionnellement utilisés par voie orale dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations, flatulence ;

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

pour faciliter les fonctions d'élimination urinaire et digestive ; comme cholérétique ou cholagogue (**Bruneton**, 2009). Le Romarin, en usage local, a deux indications : il est traditionnellement utilisé en cas de rhume et de nez bouché et en bain de bouche pour l'hygiène buccale, et Lors de la constitution d'un dossier "abrégé" d'AMM (poudre, feuille pour tisane, extrait aqueux et extraits hydroalcooliques quel qu'en soit le titre), aucune évaluation toxicologique n'est demandée (**Wichtl etAnton**,2003).

**Effets thérapeutiques** :La monographie Allemande notifie que la feuille de Romarin est utilisée par voie orale dans les troubles dyspeptiques (à la posologie de 4 à 6 grammes par jour), et par voie locale, comme thérapie de soutien des affections rhumatismales et des problèmes circulatoires (à la posologie de 50 grammes pour un bain) , mais Le Romarin peut s'utiliser de différentes manières en raison de la solubilité de ses principes actifs dans l'eau, dans l'alcool, dans l'huile et dans l'acide acétique du vinaigre(**Schneider**, 2002).

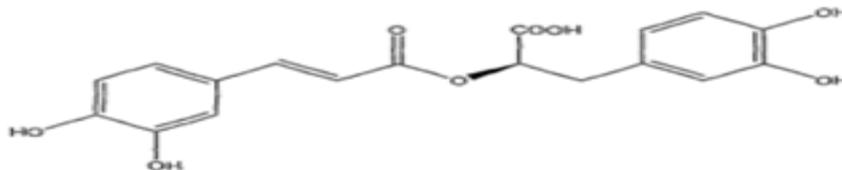
### 2.6. Chimio taxonomie du genre *Rosmarinus*

La composition chimique de la plante dans son ensemble dépend du lieu de croissance et de récolte ainsi que du moment de la récolte dans le cycle végétatif (idéal quand le végétal a le maximum d'essence) (**Staub et Bayer** , 2013). Les feuilles séchées et l'HE (de type Espagne et du type Maroc-Tunisie) de *Rosmarinus* .Sont inscrits comme drogues végétales à la Pharmacopée Européenne 11ème édition. D'après la Pharmacopée Européenne (**Anonyme** ,2013), la feuille entière séchée de *Rosmarinus* .doit avoir une teneur minimale de : - 3% de dérivés hydroxycinnamiques totaux, exprimés en acide rosmarinique (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub> ; Mt 360,3) (drogue anhydre) - 12 mL/kg d'HE (drogue anhydre). Afin de déterminer la composition chimique des feuilles et sommités fleuries de Romarin, nous avons effectué un relevé à partir de plusieurs études (Tableau 1). Nous avons pu ainsi calculer des valeurs moyennes pour les molécules les plus souvent citées.

●acides phénols :

.acide rosmarinique : 1,7-2,83% en moyenne (Figure 8).

.acide caféique : cité (= aucune valeur précisée) associé avec l'acide chlorogénique.



**Figure 8 : Acide rosmarinique(Laurent et al.,2021).**

●diterpènes phénoliques tricycliques :

- acide carnos(ol)ique ≈ 0,35%

- carnosol = picrosalvine : cité (valeur variable, jusqu'à 4,6% ou majoritaire)

- rosmanol

- rosmadial

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**Synthèse** : L'HE de Romarin, en fonction de ses chimio types, n'a pas la même composition d'un point de vue quantitatif mais a pratiquement la même composition au niveau qualitatif (Tableau 1).

**Tableau 1 : Récapitulatif de la composition chimique des différents chémotypes d'huile essentielle de *Rosmarinus* (Laurent et al.,2021).**

Molécules	CT camphre	CT 1,8 cinéole	CT verbénone
1,8 cinéole	16-25%	38-55%	9,53%
Camphre	13-21%	5-15%	7,17%
Alpha-pinène	18-26%	9-14%	27,3%
Bornéol	2,0-4,5%	1,5-5,0%	4,96%
Acétate de bornyle	0,5-2,5%	0,1-1,5%	12,52%
Verbénone	0,7-2,5%	<0,4%	7,06%
p-cymène	1,0-2,2%	0,8-2,5%	1,52%
Myrcène	1,5-5%	1-2%	2,29%
Camphène	8-12%	2,5-6%	7,91%
Limonène	2,5-5%	1,5-4%	3,96%
Beta-pinène	2-6%	4-9%	2,53%
Alpha-terpinéol	1,0-3,5%	1,0-2,6%	1,40%
Beta-caryophyllène			traces
Alpha-terpinène			0,56%
Linalol			2,23%
Terpinolène			1,03%

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

### CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES

#### 1. Matériel et méthodes

##### 1.1. Matériel biologique

##### 1.1.1. Matériel végétale

Le modèle végétal convoité a été récoltée au niveau de deux sites différents, Jardin d'Essais d'El Hama (*Rosmarinus officinalis*) et Mausolée royal de Maurétanie à Tipaza (*Rosmarinus tournefortii*).

##### 1.1.2. Matériel animal.

Le matériel biologique destiné à l'évaluation de l'efficacité des huiles essentielles formulées de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* sous l'effet des différents stimulateurs est limité au 4ème stade larvaire du nuisible à la santé publique *Culex pipiens* prélevés du plan d'eau stagnante de la station expérimentale de l'université de Blida 1, Faculté SNV Département des biotechnologies. La période d'essai s'est étendue du début Avril jusqu'à la fin mai 2021.



Figure 9 : Gitelarvaires de moustiques (Original ,2021).

#### 2.2. Méthodes d'étude de l'activité larvicide des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* sous l'effet des différents stimulateurs.

##### 2.2.1. Méthode d'échantillonnage.

La récolte des larves de moustiques a été conduite selon la méthode préconisée par **Rioux et al. (1965)**, connue sous le nom de coup de louche « Dipping ». La méthode consiste à plonger, en plusieurs endroits du gîte larvaire, un récipient prolongée par un manche assez long pour pouvoir atteindre les endroits difficiles d'accès. Par ailleurs, la collecte des larves a été réalisée en s'approchant lentement du gîte car toute perturbation est susceptible de faire plonger les larves et les nymphes au fond du gîte et de les rendre inaccessibles. Cette collecte consiste à se positionner face au soleil de sorte que l'ombre ne balaie pas la surface du gîte, en restant immobile, pendant quelques secondes, pour permettre aux larves de reprendre leur activité normale et de plonger la louche doucement

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

dans l'eau suivant un angle de 45°C et la retirer d'un mouvement uniforme en évitant les remous puis verser le contenu de la louche dans un contenant (bouteille en plastique) en prenant soin de bien l'étiqueter. et de ne pas fermer les bouteilles hermétiquement pour permettre aux larves de respirer et enfin reporter sur le carnet d'annotation toutes les informations concernant le gîte avant de les rapporter au laboratoire.

### 2.2.2. Identification des larves de *Culex pipiens*.

Cette étape de l'étude a été réalisée au laboratoire de Phytopharmacie (département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Blida1). Elle consiste à identifier morphologiquement les larves de *Culex* par la méthode isolement-éclaircissement-montage. Seules les larves du 4<sup>ème</sup> stade ont été utilisées pour l'identification vue leur facilité de manipulation et leur chétotaxie (Bouadiba *et al.*, 2012).

D'après Messai *et al.* (2012), le montage des larves se fait, en premier lieu, par la réhydratation des larves conservées dans de l'alcool dans un bain d'eau distillée pendant quelques minutes. Puis, leur éclaircissement dans une solution de potasse (KOH) à 10% pendant environ 10 minutes, leur rinçage à l'eau distillée (3 bains de 2 à 5 minutes), leur déshydratation par passage dans de l'alcool à concentration croissante (70°, 90° et 100°) pendant 15 minutes pour éliminer l'eau contenue dans l'échantillon. Et enfin, leur montage entre lame et lamelle dans une goutte de baume du Canada, en sectionnant à l'aide d'une fine aiguille la larve au niveau du 7<sup>ème</sup> segment abdominal en deux parties. La partie antérieure est montée face dorsale et la partie postérieure est montée latéralement. Les larves préparées seront examinées sous un microscope photonique (fig ., 10).



Figure 10: Méthode d'identification des larves de *Culex pipiens* (Originale, 2021).

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

L'identification a été faite grâce au programme clés « Les Moustiques de l'Afrique méditerranéenne », réalisé par l'IRD de Montpellier en collaboration avec l'institut Pasteur de Tunis (Brunhes *et al.*, 1999) (fig. 11).

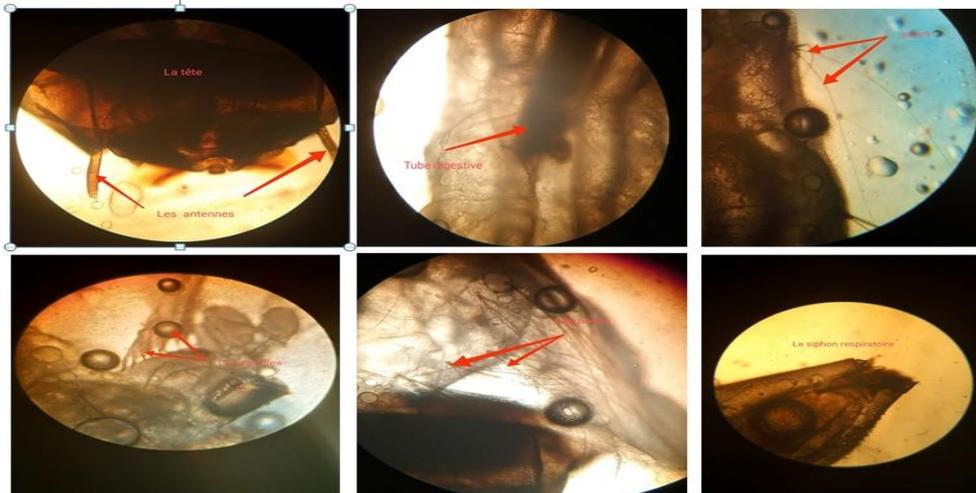


Figure 11: Critères d'identification des larves de *Culex pipiens*(Gx10)  
(Originale, 2021).

### 2.2.4. Formulation des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii*.

La formulation a été préparée selon la méthode décrite par le Pr Djazouli Z .E .(2014). Elle est obtenue par l'utilisation d'huiles essentielles (7%) comme matière active auquel un mélange de mouillant, de pénétrant et de tension actif sont ajoutés, après une agitation active à l'agitateur.

### 2.2.5. Dilutions des huiles essentielles formulées et présentation du témoin positif.

Trois doses de concentrations ascendantes ont été préparées par les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii*. Les doses préconisées pour la phytopréparation formulée sont comme suite : D1 (0, 5ml/100ml), HEFD2 (1ml/100ml) D3 (1,5ml/ 100ml). L'effet des différentes dilutions est comparé aux témoins négatifs relatifs (l'eau stagnante dugite).

Ainsi que du témoin positif (sans matière active) ont été appliqués avec trois doses différentes D1 (0,5 ml formulation Mère/100ml d'eau dugite) et D2 (1,5ml formulation Mère/100ml d'eau dugite) et D3 (3ml formulation Mère/100ml d'eau du gite).

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

### 2.2.6. Comparaison l'effet des différentes phytopréparation a base de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* à un produit de synthèse 'spinosad'.

#### 2.2.6.1 .Présentation du Spinosad

Le spinosad est un insecticide d'origine biologique composé d'un mélange de deux métabolites (spinosynes A et D) synthétisés par la bactérie *Saccharopolyspora spinosa*, du groupe des actinomycètes. Le mode d'action du spinosad est unique car il agit à la fois sur les récepteurs GABA et nicotiques (Salgado, 1998). Le spinosad possède une très faible toxicité pour les mammifères [(DL50 pour le rat par ingestion de 3 783 à 5 000 mg/kg (Tomlin, 2000), l'environnement et la faune non cible (**DowElenco**,1994 ; **Miles etDutton**, 2000 ; **Williams et al.**, 2003)]. Il est par exemple 100 à 1 000 fois moins toxique pour la faune aquatique et en particulier les poissons que les insecticides de la famille des pyréthriinoïdes (Bret *et al.*, 1997). Sur les souches sensibles aux insecticides de trois moustiques d'intérêt médical : *Aedes. aegypti*, *Anopheles. gambia.* et de *Culex. Quinquefasciatus*, les concentrations létales 50 (CL<sub>50</sub>) ont été respectivement de 0,35 ; 0,01 ; et 0,093 mg/L. Une autre étude réalisée avec un concentré émulsifiable (EC) de spinosad titrant 4,8 % de matière active a donné des CL<sub>50</sub> de 0,0096 mg/L sur *Aedes. aegypti*, 0,0064 mg/L sur *Culex. pipiens* et de 0,039 mg/L sur *Anophels . stephensi* (Romi *et al.*, 2006).

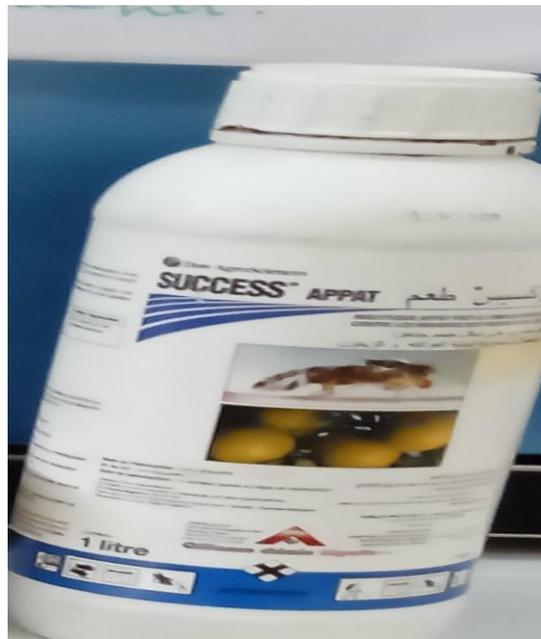


Figure12: Produit du synthese 'spinosad'.

#### 2.2.6.2 Dilution du Spinosad

Les doses préconisées pour le Spinosad sont comme suites :

SPD1 (0,5ml/100mld'eau),

SPD2 (1 ml/100ml d'eau).

SPD3 (1 ,5ml/100ml d'eau).

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

### 2.2.7 .Application des traitements

Les tests d'évaluation des potentialités larvicides des phytopréparations à base d'huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* *Rosmarinus tournefortii* à l'égard des larves du 4eme stade larvaire de *Culex pipiens* ont été conduit selon le protocole de l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S,2005). Les expérimentations ont été réalisées dans des gobelets de 5cm de diamètre, avec de 10 larves de moustiques. Dans chaque gobelet, a été versé un mélange constitué de 100ml d'eau du gîte de moustiques additionnée de la dose correspondante de solution de larvicide. Les traitements sont réalisés au niveau du laboratoire de Biotechnologie des productions végétales du Département de biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Blida1, dans des conditions ambiantes (25 - 28°C et 60-80 H %). L'essai est réalisé en 5 répartitions étalées sur une période de 6h pour les phytopréparations à base d'huile essentielle.



Figure 13 : Application des traitements (huile essentielle, formulation liquide, produit de synthèse), (Originale, 2021).

### 2.2.8. Estimation du taux de mortalité

Selon **Marmonieret al.** (2006), le taux de mortalité est le taux de disparition d'individus dans des conditions d'environnement données (varient en fonction de la population considérée et des facteurs du milieu). Il est donné par la diminution de la population par mortalité/variation du temps.

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

### 2.2.8.1. Calcul du pourcentage de la mortalité observée

Le pourcentage de mortalité observée chez les individus témoins et testé été estimé par la formule suivante :

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

### 2.2.8.2. Estimation de la mortalité corrigée

Le nombre d'individus dénombrés morts dans une population traitée par un toxique n'est pas le nombre réel d'individus tués par ce toxique. Il existe, en fait dans toute population traitée une mortalité naturelle qui vient s'ajouter à la mortalité provoquée par ce toxique, les pourcentages de mortalité doivent être corrigés par la formule d'**Abbott** (1925).

$$\text{Mortalité corrigée} = \frac{M_2 - M_1}{100 - M_1} \times 100$$

**Avec :**

M1 : pourcentage de mortalité dans le témoin

M2 : pourcentage de mortalité dans le lot traité

Si la mortalité du témoin dépasse 20% le test est annulé

### 2.2.8.3. Estimation de la mortalité corrigée

L'efficacité d'un produit biocide est évaluée par la mortalité de l'organisme cible.

Cependant, le nombre d'individus dénombrés morts dans une population traitée par un toxique n'est pas le nombre réel d'individus tués par ce toxique. Il existe en fait dans toute population traitée une mortalité naturelle qui vient s'ajouter à la mortalité provoquée par le toxique, pour cela les pourcentages de mortalité doivent être corrigés par la formule de SCHNEIDER-ORELLI qui est la suivante :

$$\text{MC}\% = (M - M_t \times 100) / (100 - M_t)$$

Avec :

MC (%) : Pourcentage de mortalité corrigée

M (%) : Pourcentage de morts dans la population traitée

M t (%) : Pourcentage de morts dans la population témoin

## 2.3. Méthodes d'étude de l'effet antioxydant des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* issues de différents modes culturaux.

La méthode de piégeage du radical DPPH a été utilisée afin d'évaluer l'effet antioxydant des huiles essentielles du romarin. Le radical DPPH• est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (**Bozin et al.**, 2008).

Cette méthode est basée sur la réduction du radical DPPH qui possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et le DPPH reste dans sa forme monomère

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

relativement stable à température ordinaire (**Popovici et al.**, 2009). Cette délocalisation donne également lieu à la couleur violette foncée caractérisée par une absorbance dans une solution d'éthanol centrée à environ 517 nm (**Szabo et al.**, 2007 ; **Wang et al.**, 2007).

Quand une solution de DPPH (DPPH•) est mélangée avec une substance antioxydante qui peut céder un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite DPPH-H (DPPH) avec perte de cette couleur violette en une adoption d'une couleur jaune pâle (**Szabo et al.**, 2007).

Le virage vers cette coloration et l'intensité de cette coloration dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (**Scherer et Godoy**, 2009).

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence comme l'acide ascorbique (Vitamine C) et les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le BHA (butyl-hydroxy- anisole) (**Molyneux**, 2004 ; **Popovici et al.**, 2009).

### 2.3.1. Technique

#### **Préparation de la solution méthanolique à DPPH.**

4 mg de DPPH + 100 ml de Méthanol = Solution méthanolique de DPPH à 0,004% = Solution mère.

#### **Préparation des solutions méthanoliques (différentes concentrations) à huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus Tournefortii*.**

Nous avons pris 4 doses de chaque huile respectivement (10, 50, 100, et 500 µg/ml), après nous avons ajouté 1 ml de méthanol pour chaque solution

Ex : 10 (µg) d'HE + 1 ml de méthanol = solution 1 HE.

#### **Préparation des solutions méthanoliques (différentes concentrations) à vitamine C.**

Nous avons pris les mêmes doses de l'huile essentielle D1, D2, D3 et D4 respectivement (10, 50, 100 et 500 µg/ml).

Ex : 10 (µg) de vit C + 1 ml de méthanol = solution 1 Vit C.

50 µl de chacune des solutions méthanoliques de l'huile essentielle sont mélangées avec 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004 %).

Ex : 50 µl de la solution 1 HE + 5 ml de la solution mère de DPPH.

50 µl de chacune des solutions méthanoliques de la vitamine C ont mélangées avec 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004 %).

Ex : 50 µl de la solution 1 Vit C + 5 ml de la solution mère de DPPH.

Laisser incuber les différentes solutions préparées pendant 30 minutes à la température du laboratoire, Puis faire la lecture au spectrophotomètre, l'absorbance est lue à 517 nm.

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

### 2.3.2. Détermination du pourcentage d'inhibition IC50

Selon **Sharififar et al.** L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (1%) est calculée de la manière suivante :

$$I\% = \frac{A_{blanc} - A_{\text{échantillon}}}{A_{blanc}}$$

Avec :

A blanc : Absorbance du blanc (metanol)

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

La cinétique des réactions de l'huile essentielle et de la vitamine C avec le DPPH• a été inscrite à chaque concentration examinée. Les concentrations en huile essentielle et en vitamine C, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydante requise pour diminuer la concentration du DPPH• initiale de 50 %.



(A) : Application d'une solution mer, (B) : Détermination du pourcentage.

**Figure 14: Méthodes d'étude de l'effet antioxydante des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* issues de différents modes cultureux (Originale, 2021).**

### 3. Analyses statistiques des données

L'analyse statistique a concerné l'évaluation de l'activité larvicide des phytopréparations à base d'huiles essentielles formulées de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* sur les larves du quatrième de stade larvaire *Culex pipiens*. Les analyses de la variance sont faites sur des moyennes homogènes adoptées sur la base d'un coefficient de variance (C.V. <15%). La tendance de la variation temporelle des mortalités observées des larves de *Culex pipiens* par rapport à leurs réactions aux différentes phytopréparations à base d'huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* et le produit de synthèse ont été établies par une analyse en composante principale (A.C.P.). La projection des variables sur les deux axes de l'analyse multivariée a été conduite par le logiciel (PAST vers. 1.37) (**Hammer et al.,2001**). La signification des comparaisons des moyennes a été confirmée par un test de comparaison par paire (Test Tukey). Les contributions significatives retenues sont au seuil d'une probabilité de 5%.

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

### CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

La présente étude vise l'estimation des potentialités larvicides à l'égard des formes larvaires de moustiques *Culex pipiens* et l'activité antioxydante des huiles essentielles de deux espèces du romarin (*Rosmarinus Officinalis* et *Rosmarinus Tournefortii*). Les huiles essentielles testées sont obtenues suite à l'apport de différents stimulateurs (lombricompost liquide, lombricompost solide, eau courante et eau saline).

#### **1. Potentialité larvicide de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* issues de différents modes culturaux a l'égard des larves L4 de *Culex pipiens*.**

L'étude du pouvoir biocide par contact direct des huiles essentielles formulées de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* a été testée sur L4 de *Culex pipiens* dans le but d'estimer la variation temporelle et la mortalité observée et corrigée des L4.

#### **1.1 .Etude comparée de l'activité larvicide de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* sous l'effet de différent stimulateur et du Spinosed sur L4 de *Culex pipiens*.**

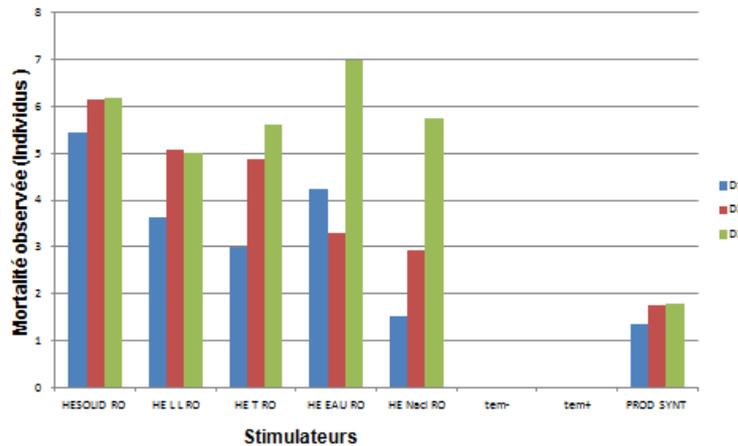
Selon la figure (15) la mortalité observée chez le quatrième stade larvaire de *Culex pipiens* sous l'effet de différents stimulateurs de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* et du Spinosed montre un effet larvicide plus important selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif  $D1 < D2 < D3$ .

La mortalité signalée sous l'effet des différents traitements est supérieure de la mortalité signalée chez les différents témoins en effet les témoins ne provoquent pas des mortalités.

*Rosmarinus officinalis* sous l'effet de tous les stimulateurs étaient plus toxiques par rapport au Spinosed.

L'huile essentielle formulées de *Rosmarinus officinalis* traité par l'eau est révélée la plus toxique (7 individus morts).

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION



HE SOLID RO : Huile essentielle , Lombricompost solide ,*Rosmarinus officinalis* .HE LLRO : Huile essentielle ,Lombricompost liquide ,*Rosmarinus officinalis* .HE T RO :Huile essentielle Témoin ,*Rosmarinus officinalis*.HE EAU RO ;Huile essentielle eau *Rosmarinus officinalis* .tem- :Témoin négatif .tem+ :Témoin positif .PROD SYNT :Produit de synthèse 'Spinosad '

D1=0,5ml /100ml d'eau .D2=1ml/100ml d'eau.D3=1,5ml/100ml d'eau

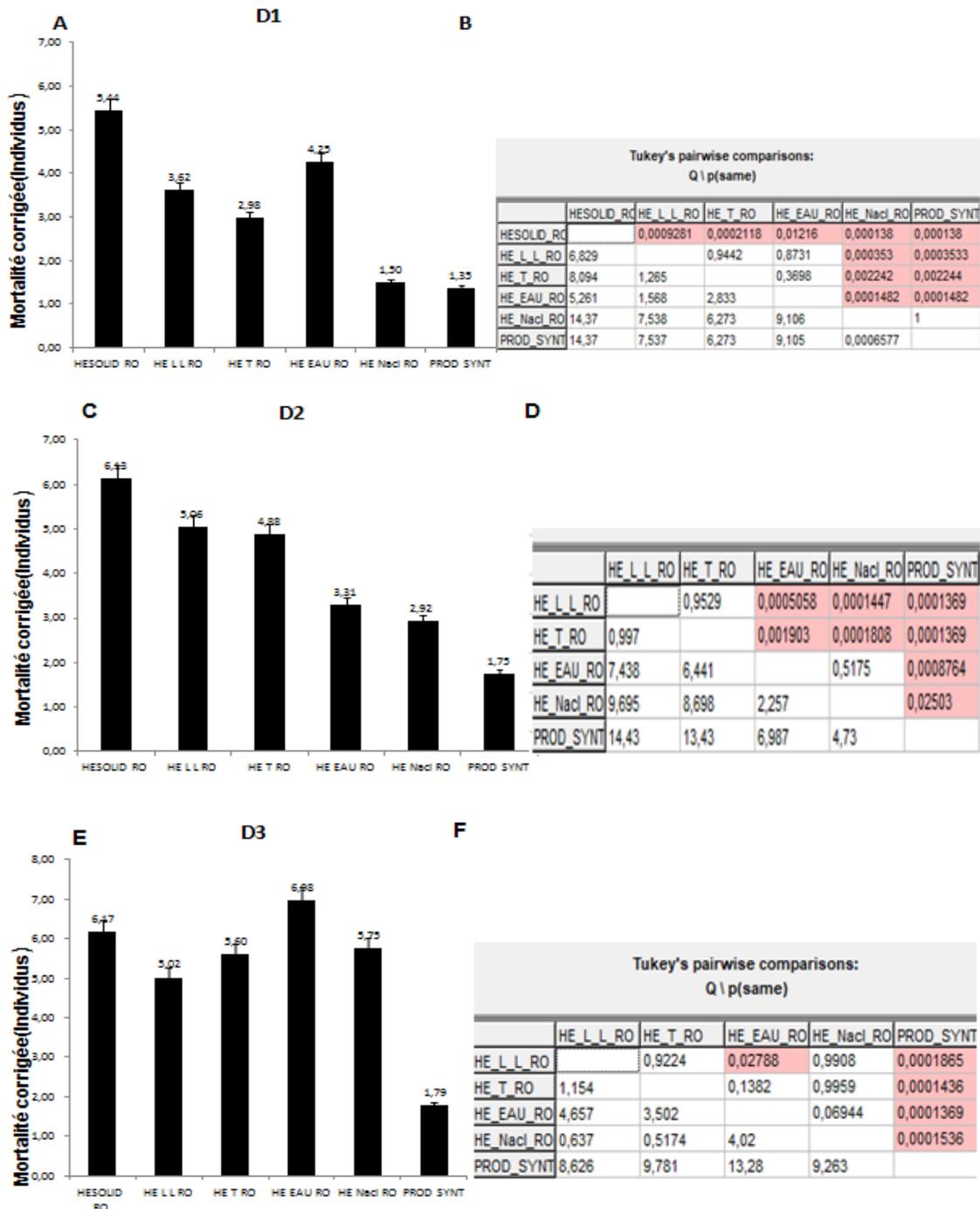
**Figure 15: Variation des mortalités observées selon le facteur dosé d'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosad**

### 1.2 .Estimation de mortalités corrigées des huiles essentielles formulées de *Rosmarinus officinalis* sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosad sur L4 de *Culex pipiens* .

D'après les résultats obtenus (fig.16 A et C.) l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* traité par le **lombricompost solide** est révélée la plus toxique à l'égard de 4eme stade larvaire de *Culex pipiens* à la dose D1, D2 et respectivement et l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* traité par l'eau de ville est révélée très toxique à la dose D3 (fig . 16 E).Cependant, la forte, moyenne et faible dose (D1, D2 et D3) de Spinosad, affiche des mortalités corrigées faible par rapport à l'effet des autres traitements en termes de mortalité minimale (fig . 16 A, C et E).

Selon le test de Tukey est consigné dans la (fig 16B, D et F) , nous remarquons que *Rosmarinus officinalis* sous l'effet de différents stimulateurs (Lombricompost solide ,lombricompost liquide,sel et l'eau de ville) )el le produit de synthèse 'Spinosad' enregistrent unedifférence très hautement significative sur la mortalité corrigée de 4eme stade larvaire de *Culex pipiens* pour l'ensemble des formulations ( $p < 0,0001\%$ ).

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION



HE SOLID RO : Huile essentielle , Lombricompost solide ,*Rosmarinus officinalis* .HE LLRO : Huile essentielle ,Lombricompost liquide ,*Rosmarinus officinalis* .HE T RO :Huile essentielle Témoin ,*Rosmarinus officinalis*.HE EAU RO ;Huile essentielle eau *Rosmarinus officinalis* .tem- :Témoin négatif .tem+ :Témoin positif .PROD SYNT :Produit de synthèse 'Spinosad '

D1=0,5ml /100ml d'eau .D2=1ml/100ml d'eau. D3=1,5ml/100ml d'eau

**Figure 16 : Variation des mortalités corrigées selon le facteur dose des huiles essentielles formulées de *Rosmarinuus officinalis* sous l'effet de différents stimulateurs etdu Spinosad**

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

### 1.3 .Evolution temporelle de la mortalité observée des huiles essentielles formulées de *Rosmarinus officinalis* sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosad sur L4 de *Culex pipiens* .

Selon la figure (17A),l'évolution temporelle de la mortalité observée chez le quatrième stade larvaire de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* traité par le lombricompost solide et du Spinosad montre un effet larvicide plus important selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif  $D1 < D2 < D3$  pour l'huile essentielle.L'efficacité des traitements et du Spinosad apparait respectivement dès30 minutes et 2hd'exposition des larves L4 pour l'ensemble des doses l'activité larvicide du principe actif s'accroît graduellement dans le temps. Elle affiche des mortalités importantes après 1h d'exposition (fig .17 )

L'analyse en composantes principales (A. C. P),(fig. 17B) effectuée sur la base des valeurs des mortalités observées des L4 de *Culex pipiens* est satisfaisante pour les paramètres étudiés (facteur temps et facteur dose) dans la mesure où plus de 90% de la variance est exprimée sur les deux premiers axes .

La projection des valeurs des mortalités observées des larves de *C. pipiens* sur le premier axe 1 (92,21%) montre que les différentes doses de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* traité par lombricompost solide et le Spinosad annoncent une corrélation positive avec le temps d'exposition (fig. 17 B).

Les projections des vecteurs relative aux mortalités observées informent que l'huile essentielle formulée aux doses HE-D1, HE-D2 et HE-D3 montrent leurs potentiel larvicide à l'égard des larves L4 de *C. pipiens*dès3h d'exposition alors que le Spinosad sous les doses D1-PS ,D2-PS et D3-PS affirme leurs efficacité que vers 4h30minutes d'exposition.

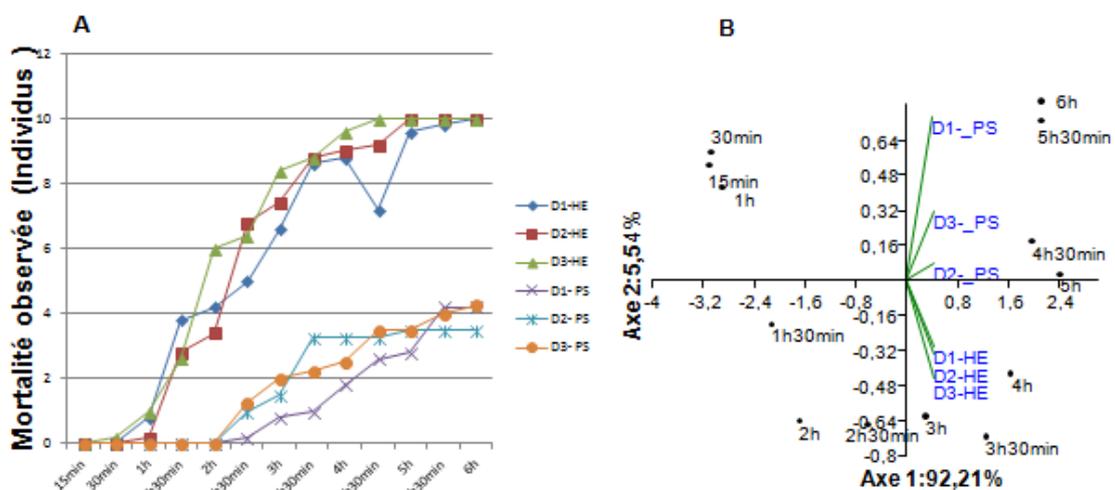


Figure 17: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* traité par lombricompost solide et du Spinosad

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Les larves L4 de *Culex pipiens* enregistrent des mortalités observées plus imposant selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif D1<D2<D3 pour l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* traité par lombricompost liquide et le Spinosad (fig. 18 A).

L'efficacité des phytopréparations et du Spinosad apparait respectivement dès 30minutes et 2h d'exposition des larves L4 (fig. 18 A). Sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* traité par lombricompost liquide l'activité larvicide du principe actif s'accroît graduellement dans le temps. Elle affiche des mortalités importantes après 1h30minutes d'exposition.

L'analyse en composantes principales (A. C. P) effectuée sur la base des valeurs des mortalités observées des L4 de *Culex pipiens* est satisfaisante pour les paramètres étudiés (facteur temps et facteur dose) dans la mesure où plus de 90% de la variance est exprimée sur les deux premiers axes (fig. 18B).

La projection des valeurs des mortalités observées des larves de *C. pipiens* sur le premier axe 1 (95,73%) montre que les différentes doses de la phytopréparation formulée à base d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* traité par lombricompost liquide et le Spinosad annoncent une corrélation positive avec le temps d'exposition (fig. 18 B). Les projections des vecteurs relative aux mortalités observées informent que l'huile essentielle formulée aux doses HE-D2 et HE-D3 ainsi que le Spinosad sous la dose D2-PS montrent leur potentiel larvicide à l'égard des larves L4 de *C. pipiens* dès 3h30m d'exposition. Quant aux doses moyenne (D2-PS) et faibles (D1-PS et HE-D1) leur efficacité ne s'affirme que vers 5h30m d'exposition.

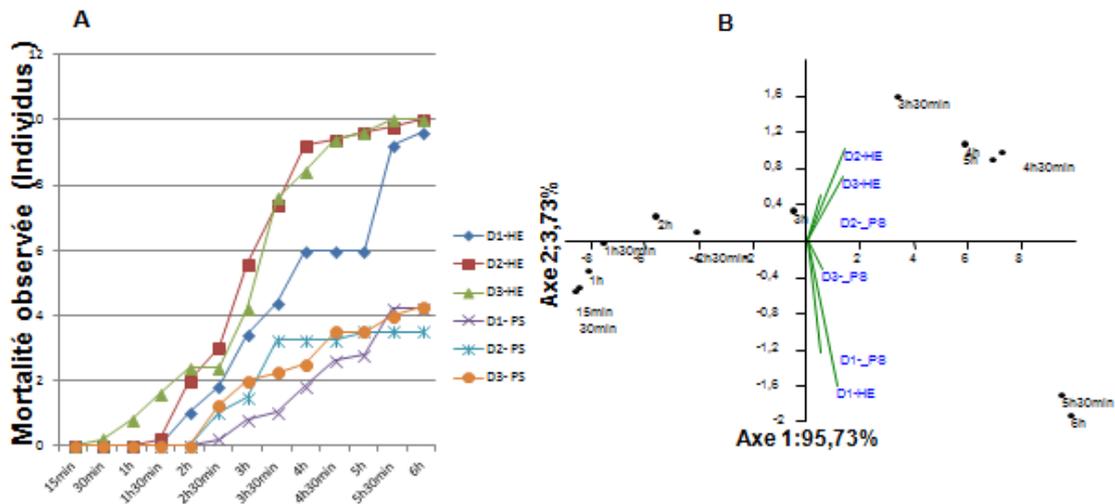


Figure 18 : Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* traité par lombricompost liquide et du Spinosad

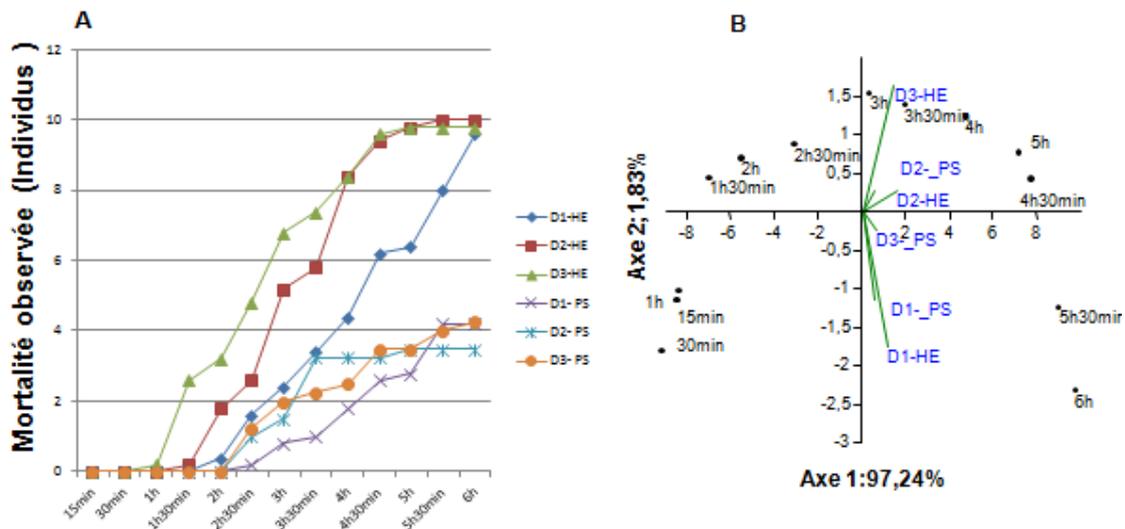
## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Selon la **fig. (19A)**, l'évolution temporelle de la mortalité observée chez le quatrième stade larvaire de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* non traité (témoin) et ainsi le Spinosad montrent un effet biocide plus important pour la dose D1 suivie de la dose D2 puis de la dose 3.

l'efficacité de la phytopréparation à base d'huile essentielle formulée apparaît au bout de 1h alors que l'efficacité du Spinosad apparaît dès 2h. Cette efficacité s'accroît au fur et à mesure dans le temps (fig. 19 A)

L'analyse en composantes principales (A. C. P) effectuée sur la base des valeurs des mortalités observées de L4 de *Culex pipiens* est satisfaisante pour les paramètres étudiés (facteur temps et facteur dose) dans la mesure où plus de 90% de la variance est exprimée sur les deux premiers axes (fig. 19 B).

La projection des valeurs de la mortalité observée des larves de *C. pipiens* sur le premier axe 1 (97,24%) montre que les différentes doses d'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* non traité (témoin) et le Spinosad annoncent une corrélation positive avec le temps d'exposition (fig. 19 B). Les projections des vecteurs relative aux mortalités observées informent que l'huile essentielle formulée aux doses D3-HE et D2-HE ainsi que le Spinosad sous la dose D2-PS montrent leur potentiel larvicide à l'égard des larves L4 de *C. pipiens* dès 3h30min d'exposition. Les doses D1-HE et D1-PS et D3-PS leur efficacité ne s'affirme que vers 5h30min d'exposition (fig. 19 B).



**Figure 19: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* non traité (témoin) et du Spinosad**

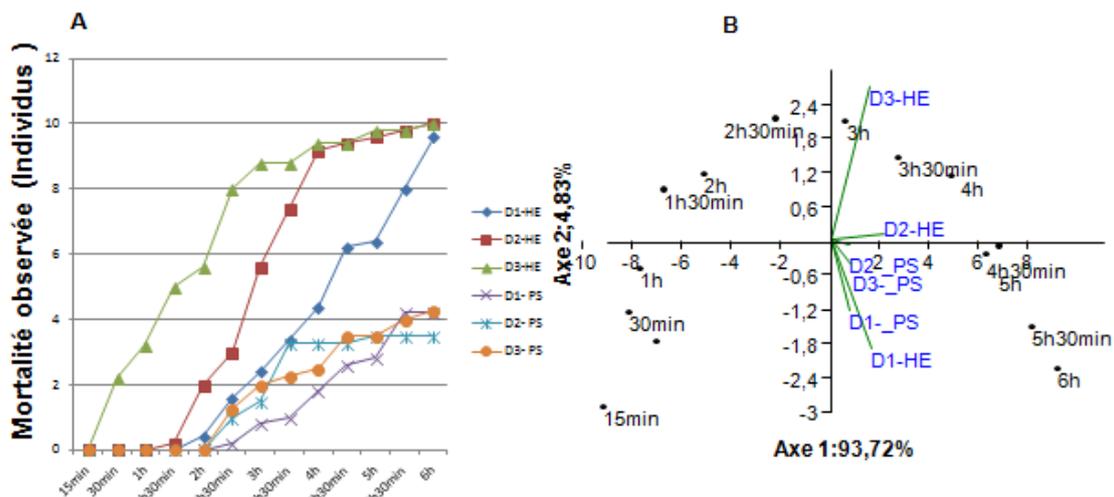
D'après la **figure (20A)**, l'application d'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* traitée par l'eau de ville sur le quatrième stade larvaire a occasionné une mortalité importante pour les deux doses D1-HE et D2-HE à partir de 1h30h par contre la D3-HE montre leur efficacité au bout de 15m. Une gradation biocide positive s'installe en termes de dose: D1-HE < D2-HE < D3, HE au bout de 6h, l'efficacité des phytopréparations et du

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Spinosad apparait respectivement dès 15min et 2h d'exposition des larves L4 pour l'ensemble des doses.

L'analyse en composantes principales (A C P) effectuée avec le logiciel PAST à partir des valeurs de la mortalité observée de L4 montre un effet temporel très contrasté de l'huile essentielle formulée sur les larves L4 de *Culex pipiens*. L'analyse est satisfaisante pour l'ensemble des paramètres étudiés dans la mesure où plus de 90% de la variance sont exprimés sur les axes (fig. 20A).

La projection des valeurs de la mortalité observée des larves de *C. pipiens* sur le premier axe 1 (93,72%) montre que les différentes doses d'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* non traité (témoin) et le Spinosad annoncent une corrélation positive avec le temps d'exposition (fig. 20 B), les projections des vecteurs relative aux mortalités observée informent que l'huile essentielle formulée aux doses D3-HE et D2-HE montrent leur potentiel larvicide à l'égard des larves L4 de *C. pipiens* dès 3h d'exposition. Les doses D1-HE et D1-PS, D2-PS et D3-PS et leur efficacité leur efficacité es tardive ne s'affirment que vers 4h30min d'exposition (fig. 20B).



**Figure 20: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* traité par l'eau de ville et du Spinosad.**

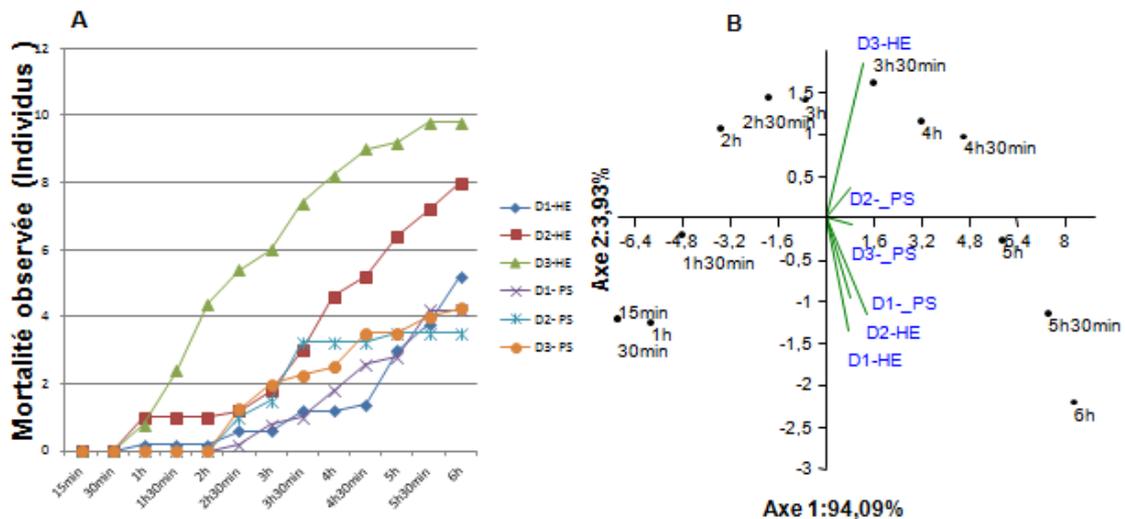
Selon la figure (21A) l'efficacité de l'huile essentielle formulée et du Spinosad apparait respectivement dès 30min et 2h d'exposition des larves L4 aux trois doses. Sous l'effet de l'huile essentielle formulée, l'activité larvicide du principe actif s'accroît graduellement dans le temps. Elle affiche des mortalités importantes comparées au Spinosad (Fig. 21A). En revanche, sous l'effet du Spinosad, la mortalité est tardive.

L'analyse en composantes principales (A C P) effectuée avec le logiciel PAST à partir des valeurs de la mortalité observée de L4 montre un effet temporel très contrasté de l'huile essentielle formulée sur les larves L4 de *Culex pipiens*. L'analyse est satisfaisante pour

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

l'ensemble des paramètres étudiés dans la mesure où plus de 90% de la variance sont exprimés sur les axes (fig. 21A).

La projection des valeurs de la mortalités observée des larves de *C. pipiens* sur le premier axe 1 (94,09%) montre que les différentes doses d'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* traité par le sel et le Spinosad annoncent une corrélation positive avec le temps d'exposition (fig. 21 B), les projections des vecteurs relative aux mortalités observée informent que l'huile essentielle formulée à la dose D3-HE et le Spinosad à la dose D2-PS montrent leurs potentiel larvicide à l'égard des larves L4 de *C. pipiens* dès 3h30min d'exposition. Les doses D1-HE et D2-PS, D1-PS et D3-PS leur efficacité est tardive ne s'affirment que vers 5h d'exposition (fig. 21B).



**Figure 21: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* traité par le sel (NaCl) et du Spinosad.**

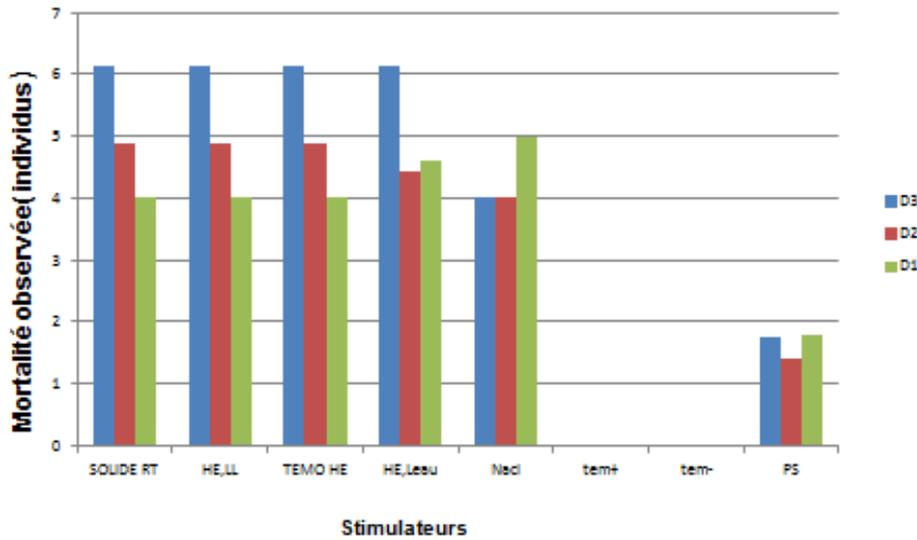
### 2.1 .Etude comparée de l'activité larvicide d'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* sous l'effet de différents stimulateur et du Spinosad sur L4 de *Culex pipiens* .

La (fig. 22) affiche l'efficacité des huiles essentielles formulées de *Rosmarinus tournefortii* sous l'effet stimulateur sur L4 de *Culex pipiens*. Il apparaît que les huiles essentielles formulées conduisent à des mortalités plus importantes par comparaison au témoin positif, témoin négatif et le Spinosad. Cette efficacité s'accroît au fur et à mesure que la concentration du principe actif augmente dans les doses de telle sorte qu'une gradation positive s'établit dans le sens D1<D2<D3. La gradation d'activité des huiles essentielles formulées se maintient chez tous les stimulateurs.

*Rosmarinus tournefortii* traité par lombricompost solide, lombricompost liquide, l'eau de ville et non traité se sont révélées les plus toxiques la dose D3. Les témoins ne provoquent pas

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

des mortalités. *Rosmarinustournefortii* sous l'effet de tous les stimulateurs étaient plus toxiques par rapport au Spinosad.



HE SOLIDE RT: Huile essentielle , Lombricompost solide ,*Rosmarinus tournefortii* .HE ,LL : Huile essentielle ,Lombricompost liquide.TEMOHE :témoin ,huile essentielle ,HE,l'eau :Huile essentielle ,l'eau.Nacl ,sel .tem- :Témoin négatif .tem+ :Témoin positif .PS :Produit de synthèse 'Spinosad'

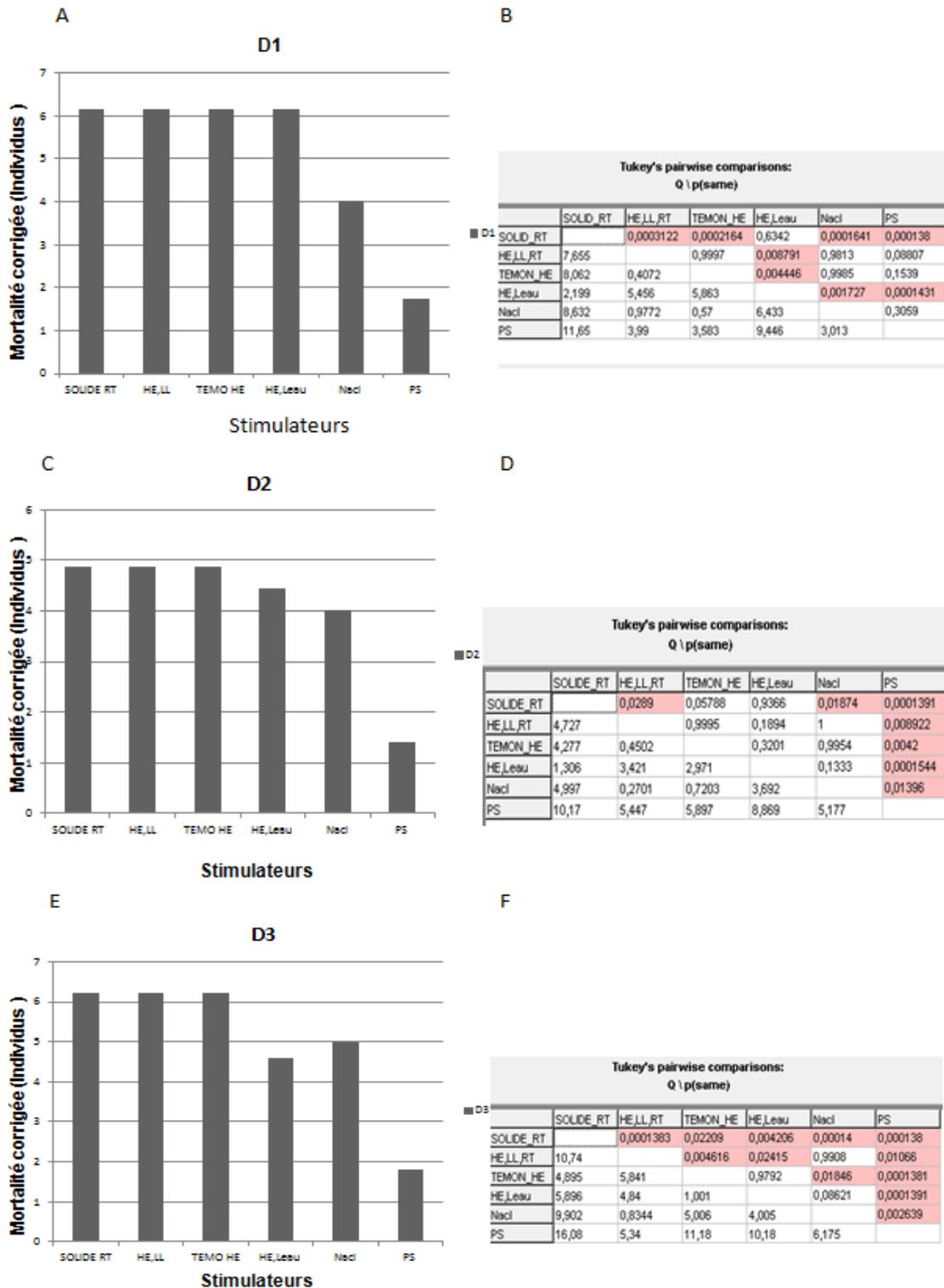
**Figure 22 : Variation des mortalités observées selon le facteur dosed'huile essentielle formulée de *Rosmarinustournefortii* sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosad.**

### 2.2.Estimation de lamortalités corrigées des huiles essentielles formulées de *Rosmarinus tournefortii* sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosad sur L4 de *Culex pipiens* .

Les résultats obtenus (fig.23 A et C.) l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* traité par le lombricompost solide ,lombricompost liquide ,l'eau et non traité se sont est révélées les plus toxiques à l'égard de 4eme stade larvaire de *Culex pipiens* à la dose D1, D2 et respectivement et l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* traité par l'eau de ville est révélée très toxique à la dose D3 (fig.23 E). Cependant, la forte, moyenne et faible dose (D1, D2 et D3) de Spinosad, affiche des mortalités corrigées faible par rapport à l'effet des autres traitements en termes de mortalité minimale (fig . 23A, C et E).

Selon le test de Tukey est consigné dans la (fig . 23B, D et F) , nous remarquons que *Rosmarinus tournefortii* sous l'effet de différents stimulateurs (Lombricompost solide ,lombricompost liquide, sel et l'eau de ville) )el le produit de synthèse 'Spinosad' enregistrent une différence très hautement significative sur la mortalité corrigée de 4eme stade larvaire de *Culex pipiens* pour l'ensemble des formulations ( $p < 0,0001\%$ ) .

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION



HE SOLIDE\_RT: Huile essentielle , Lombricompost solide ,*Rosmarinus tournefortii* .HE ,LL : Huile essentielle ,Lombricompost liquide.TEMOHE :témoin ,huile essentielle ,HE,l'eau :Huile essentielle ,l'eau.Nacl ,sel .tem- :Témoin négatif .tem+ :Témoin positif .PS :Produit de synthèse 'Spinosed'

**Figure 23 :Variation des mortalités corrigées selon le facteur dose des huiles essentielles formulées de *Rosmarinus tournefortii* sous l'effet de différents stimulateurs et du 'Spinosaad'**

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.3 .Evolution temporelle de la mortalité observée des huiles essentielles formulées de *Rosmarinus tournafortii* sous l'effet de différents stimulateurs et du Spinosad sur L4 de *Culex pipiens* .

Selon la figure (24A),l'évolution temporelle de la mortalité observée chez le quatrième stade larvaire de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournafortii* traité par le lombricompost solide et du Spinosad montre un effet larvicide plus important selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif  $D1 < D2 < D3$  pour l'huile essentielle. L'efficacité des traitements et du Spinosad apparait respectivement dès 15 minutes et 1h d'exposition des larves L4 pour l'ensemble des doses l'activité larvicide du principe actif s'accroît graduellement dans le temps. Elle affiche des mortalités importantes après 1h d'exposition.

L'analyse en composantes principales (A. C. P),(fig. 24B) effectuée sur la base des valeurs des mortalités observées des L4 de *Culex pipiens* est satisfaisante pour les paramètres étudiés (facteur temps et facteur dose) dans la mesure où plus de 90% de la variance est exprimée sur les deux premiers axes .

La projection des valeurs des mortalités observées des larves de *C. pipiens* sur le premier axe 1 (96 %) montre que les différentes doses de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournafortii* traité par lombricompost solide et le Spinosad annoncent une corrélation positive avec le temps d'exposition (fig. 24 B).

Les projections des vecteurs relative aux mortalités observées informent que l'huile essentielle formulée aux doses D2-HE, D1-PS, D2-PS et D3-PS montrent leurs potentiel larvicide à l'égard des larves L4 de *C. pipiens* dès 2h d'exposition alors que sous les D3-HE et D1-HE affirment leurs efficacité que vers 3h30minutes d'exposition (fig .24B).

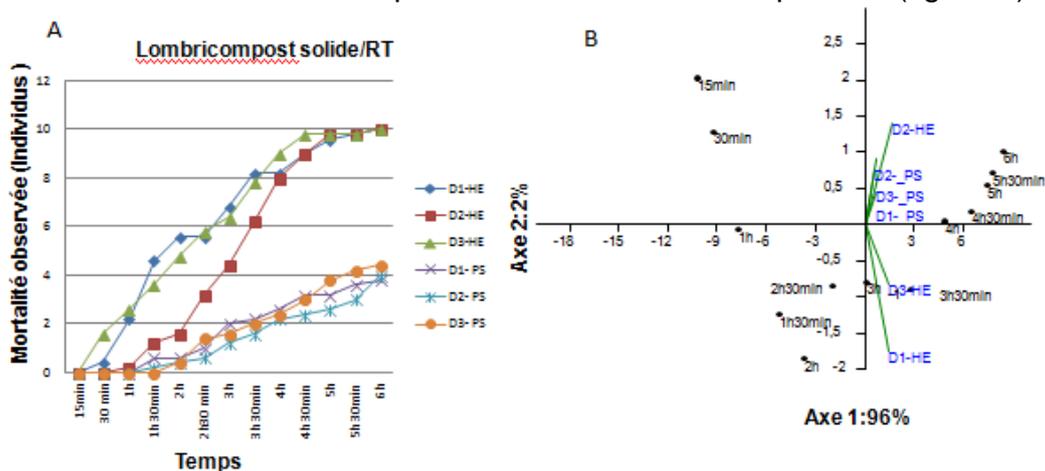


Figure 24: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournafortii* traité par lombricompost solide et du Spinosad

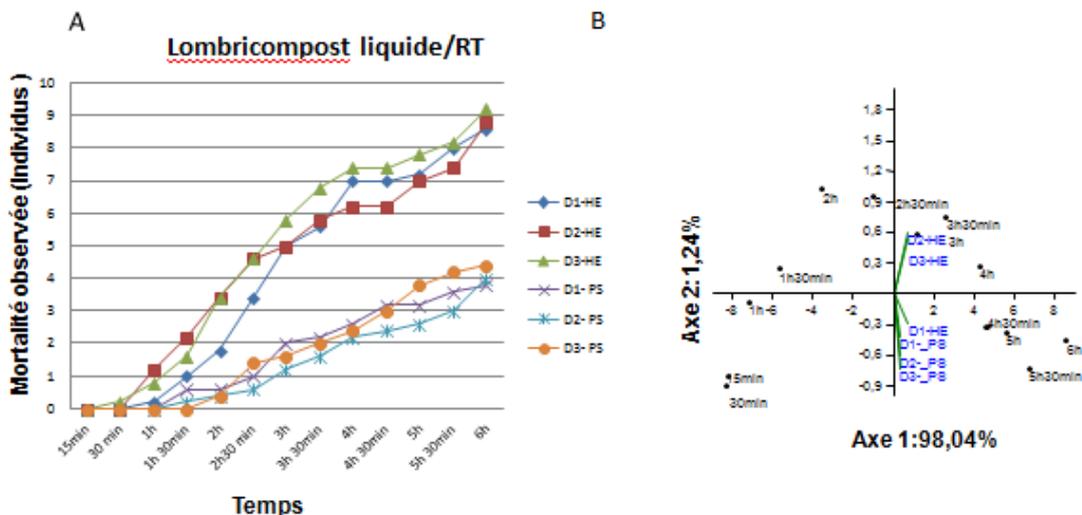
## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Les larves L4 de *Culex pipiens* enregistrent des mortalités observées plus imposant selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif  $D1 < D2 < D3$  pour l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* traité par lombricompost liquide et le Spinosad (fig. 25A).

L'efficacité des huiles essentielles formulées et du Spinosad apparait respectivement dès 15minutes et 1h d'exposition des larves L4 (fig. 25A). Sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* traité par lombricompost liquide l'activité larvicide du principe actif s'accroît graduellement dans le temps. Elle affiche des mortalités importantes après 1h30minutes d'exposition.

L'analyse en composantes principales (A. C. P) effectuée sur la base des valeurs des mortalités observées des L4 de *Culex pipiens* est satisfaisante pour les paramètres étudiés (facteur temps et facteur dose) dans la mesure où plus de 90% de la variance est exprimée sur les deux premiers axes (fig. 25B).

La projection des valeurs des mortalités observées des larves de *C. pipiens* sur le premier axe 1 (98,04%) montre que les différentes doses de la phytopréparation formulée à base d'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* traité par lombricompost liquide et le Spinosad annoncent une corrélation positive avec le temps d'exposition (fig. 25 B). Les projections des vecteurs relative aux mortalités observées informent que l'huile essentielle formulée aux doses HE-D2 et HE-D3 montrent leur potentiel larvicide à l'égard des larves L4 de *C. pipiens* dès 2h30m d'exposition. Quant aux doses forte (D3-PS) moyenne (D2-PS) et faibles (D1-PS et HE-D1) leur efficacité ne s'affirme que vers 4h30minutes d'exposition.



**Figure 25: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* traité par lombricompost liquide et du Spinosad**

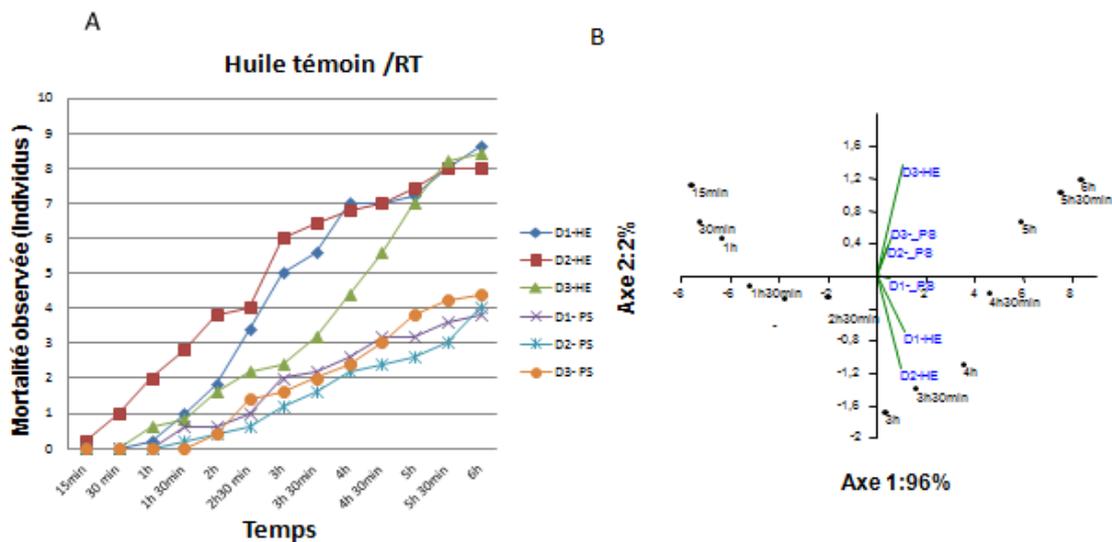
## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Selon la figure (26A), l'évolution temporelle de la mortalité observée chez le quatrième stade larvaire de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* non traité (témoin) et ainsi le Spinosad montrent un effet biocide plus important pour la dose D1 suivie de la dose D2 puis de la dose 3.

L'efficacité de la phytopréparation à base d'huile essentielle formulée apparaît au bout de 15 minutes pour la D2 et 30 minutes pour les autres doses alors que l'efficacité du Spinosad apparaît dès 1h. Cette efficacité s'accroît au fur et à mesure dans le temps (fig. 31A)

L'analyse en composantes principales (A. C. P) effectuée sur la base des valeurs des mortalités observées de L4 de *Culex pipiens* est satisfaisante pour les paramètres étudiés (facteur temps et facteur dose) dans la mesure où plus de 90% de la variance est exprimée sur les deux premiers axes (fig. 26 B).

La projection des valeurs de la mortalité observée des larves de *C. pipiens* sur le premier axe 1 (96%) montre que les différentes doses d'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* non traité (témoin) et le Spinosad annoncent une corrélation positive avec le temps d'exposition (fig. 26B). Les projections des vecteurs relative aux mortalités observées informent que l'huile essentielle formulée à la dose D3-HE ainsi que le Spinosad sous la dose D3-PS et D2-PS montrent leur potentiel larvicide à l'égard des larves L4 de *C. pipiens* dès 5h d'exposition. Les doses D1-HE et D1-PS et D2-HE leur efficacité leur efficacité ne s'affirme que vers 3h30min d'exposition (fig. 26B)



**Figure 26: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* traité non traité (témoin) et du Spinosad**

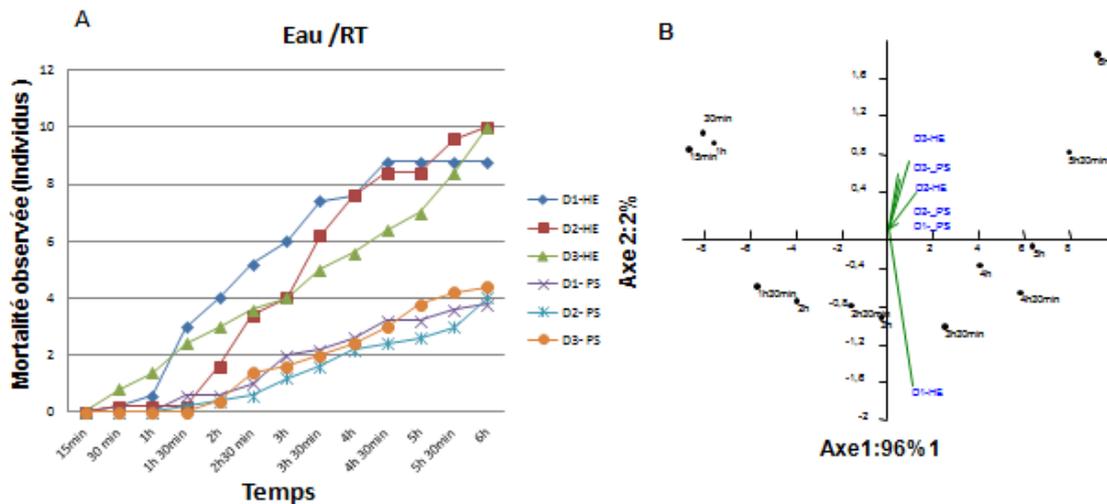
D'après la figure (27A), l'application d'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* traité par l'eau de ville sur le quatrième stade larvaire a occasionné une mortalité importante pour les trois doses D1-HE et D2-HE et D3-HE à partir de 15 minutes. Une gradation biocide positive s'installe en termes de dose: D1-HE < D2-HE < D3-HE,

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

l'efficacité des phytopréparations et du Spinosad apparait respectivement dès 15min et 1h d'exposition des larves L4 pour l'ensemble des doses.

L'analyse en composantes principales (A C P) effectuée avec le logiciel PAST à partir des valeurs de la mortalité observée de L4 montre un effet temporel très contrasté de l'huile essentielle formulée sur les larves L4 de *Culex pipiens*. L'analyse est satisfaisante pour l'ensemble des paramètres étudiés dans la mesure où plus de 90% de la variance sont exprimés sur les axes (fig. 27A).

La projection des valeurs de la mortalités observée des larves de *C. pipiens* sur le premier axe 1 (96%) montre que les différentes doses d'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* non traité (témoin) et le Spinosad annoncent une corrélation positive avec le temps d'exposition (fig. 27 B), les projections des vecteurs relative aux mortalités observée informent que l'huile essentielle formulée aux doses D1-HE , D2-HE et D3-HE ainsi que le Spinosad aux doses D2-PS et D3-PS montrent leurs potentiel larvicide à l'égard des larves L4 de *C. pipiens* dès 3h30minutes d'exposition. La dose D1-PS leur efficacité ne s'affirme que vers 4h30min d'exposition (fig. 27B).



**Figure 27: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* traité par l'eau et du Spinosad .**

Selon la figure (28A) l'efficacité de l'huile essentielle formulée et du Spinosad apparait respectivement dès 15min et 1h d'exposition des larves L4 aux trois doses. Sous l'effet de l'huile essentielle formulée, l'activité larvicide du principe actif s'accroît graduellement dans le temps. Elle affiche des mortalités importantes comparée au Spinosad. En revanche, sous l'effet du Spinosad, la mortalité est tardive.

L'analyse en composantes principales (A C P) effectuée avec le logiciel PAST à partir des valeurs de la mortalité observée de L4 montre un effet temporel très contrasté de l'huile essentielle formulée sur les larves L4 de *Culex pipiens*. L'analyse est satisfaisante pour

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

l'ensemble des paramètres étudiés dans la mesure où plus de 90% de la variance sont exprimés sur les axes (fig. 28B).

La projection des valeurs de la mortalités observée des larves de *C. pipiens* sur le premier axe 1 (97,77%) montre que les différentes doses d'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* traité par le sel et le Spinosad annoncent une corrélation positive avec le temps d'exposition (fig. 28 B), les projections des vecteurs relative aux mortalités observée informent que l'huile essentielle formulée à la dose D3-HE et D2-HE montrent leurs potentiel larvicide à l'égard des larves L4 de *C. pipiens* des 4h30min d'exposition, le Spinosad à la dose D1-PS, D2-PS et D3-PS ainsi l'huile essentielle à la dose D1-HE leur efficacité ne s'affirment que vers 4h d'exposition (fig. 28B).

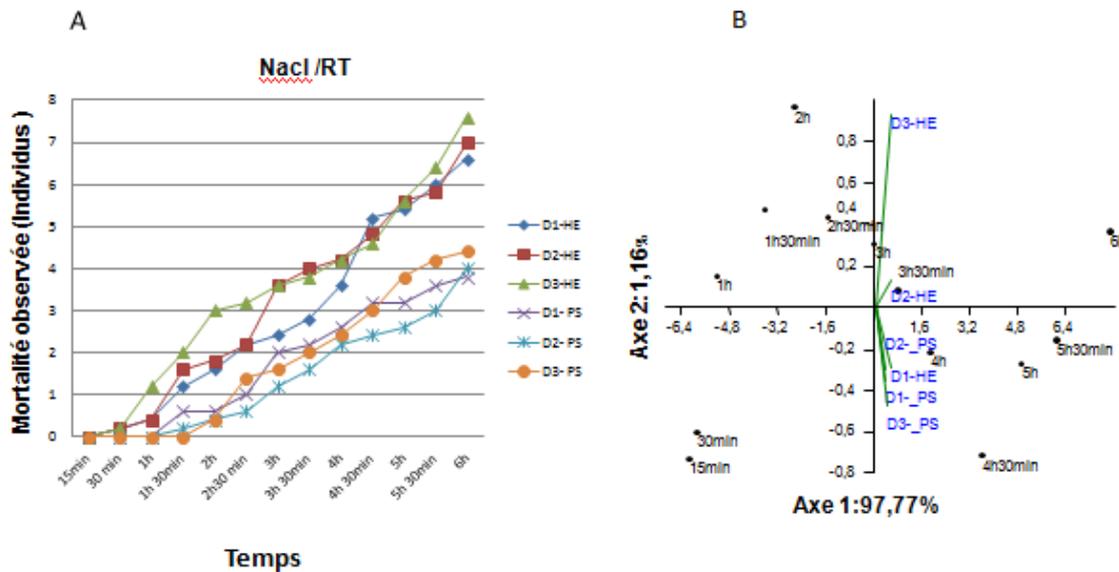


Figure 28: Variation temporelle de la mortalité observée des larves L4 de *Culex pipiens* sous l'effet de l'huile essentielle formulée de *Rosmarinus tournefortii* traité par le NaCl du Spinosad .

### 2 .Effet antioxydant des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* sous l'effet de différents stimulateurs.

L'effet antioxydant exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Le DPPH présente une coloration violette sombre mais lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes sa couleur vire vers le jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la coloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire .

#### 2.1 . Pourcentage d'inhibition de DPPH par la vitamine C et les huiles essentielles testées et détermination de la valeur IC50.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure linéaire qui signifie la réduction du DPPH en sa forme non radicalaire. La détermination des

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations utilisées (figures 29, 30 et 31) ainsi la valeur d'IC<sub>50</sub> de chaque échantillon sont obtenues à partir de ces équations.

L'IC<sub>50</sub> exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Les valeurs des IC<sub>50</sub> trouvées pour tous les échantillons testés sont représentées dans les figures 34, 35 et 36. Plus la valeur de l'IC<sub>50</sub> est faible, plus l'activité antioxydante d'un composé est appréciable.

### 2.1.1. Pourcentage d'inhibition de DPPH par la vitamine C et détermination de la valeur IC<sub>50</sub>.

Un fort pouvoir antiradicalaire est noté pour la Vit C avec 90% d'inhibition de DPPH et une IC<sub>50</sub> assez basse égale 162,53 µg/ml (fig 29).

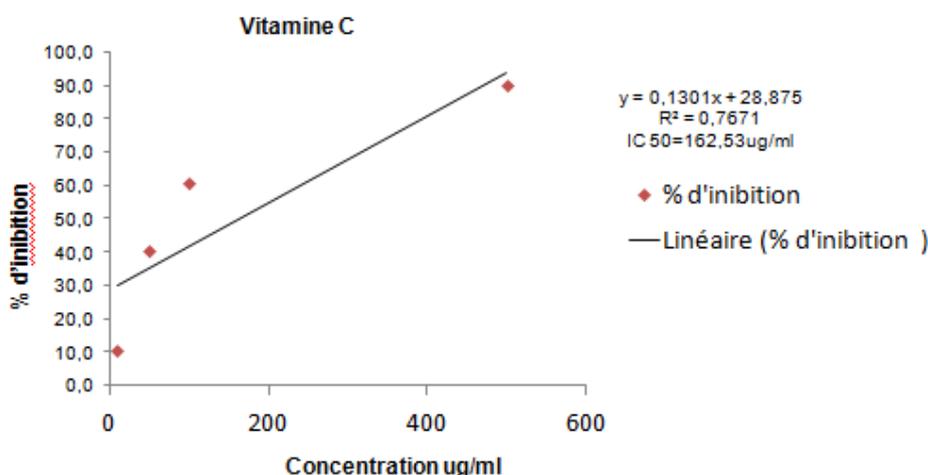


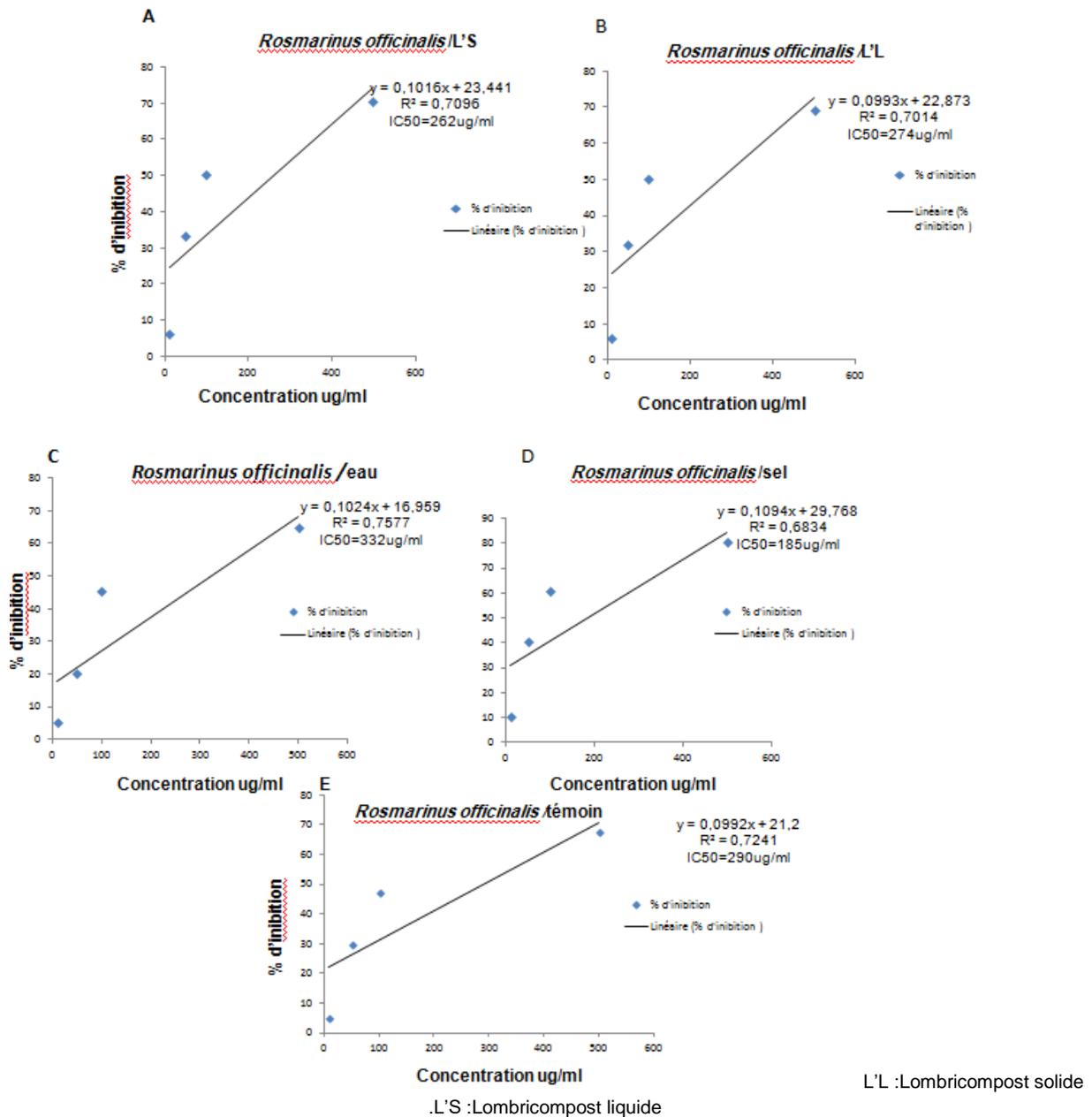
Figure 29 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par la vitamine C et détermination de la valeur IC<sub>50</sub>.

### 2.1.2. Pourcentage d'inhibition de DPPH par les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et détermination de la valeur IC<sub>50</sub>.

D'après les résultats (fig 30), le potentiel antiradicalaire des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* est inférieur à celui d'antioxydant standard utilisé (Vitamine C).

L'activité antiradicalaire est modérée pour l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* traitée par le sel avec 80% d'inhibition de DPPH et une IC<sub>50</sub> basse égale 185 µg/ml. En comparant les résultats obtenus, l'activité antioxydante est classée suivant l'ordre : Vitamine C > *Rosmarinus officinalis* /SEL > *Rosmarinus officinalis* /L'S > *Rosmarinus officinalis* /L'L > *Rosmarinus officinalis* /Témoin > *Rosmarinus officinalis* /Eau.

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

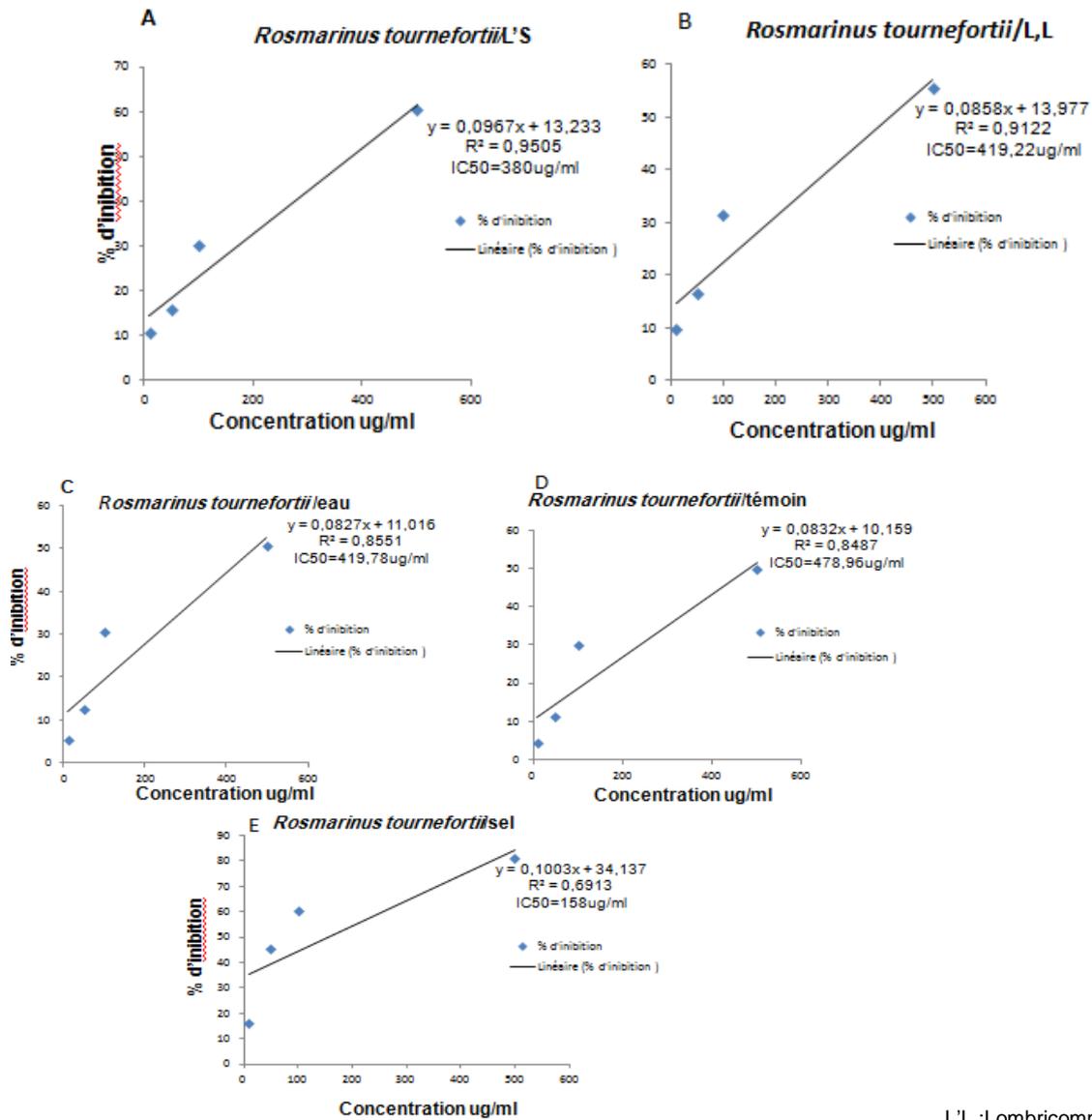


**Figure 30 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et détermination de la valeur IC50.**

### 2.1.3. Pourcentage d'inhibition de DPPH par les huiles essentielles de *Rosmarinus tournefortii* et détermination de la valeur IC50.

D'après les résultats (fig ,31), le potentiel antiradicalaire des huiles essentielles de *Rosmarinus tournefortii* est inférieur à celui d'antioxydant standard utilisé (Vitamine C). L'activité antiradicalaire est élevée pour l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* traité par le sel avec 80% d'inhibition de DPPH et une IC50 basse égale 158ug/ml. En comparant les résultats obtenus, l'activité antioxydante est classée suivant l'ordre : Vitamine C > *Rosmarinus tournefortii* /SEL > *Rosmarinus tournefortii* /L'S > *Rosmarinus tournefortii* /L'L > *Rosmarinus tournefortii* /Eau > *Rosmarinus tournefortii* /témoin.

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION



L'L :Lombricompost solide

L'S :Lombricompost liquide

Figure 31 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par les huiles essentielles de *Rosmarinus tournefortii* et détermination de la valeur IC50 .

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

### DISCUSSION GENERALE

Pour pallier aux inconvénients des insecticides chimiques et leur impact nocif sur la santé et l'environnement, les chercheurs ont eu recours à des alternatives naturels remplissant le même rôle et présentant des avantages écologiques et économiques. Il s'agit principalement des extraits des plantes aromatiques et médicinales, qui ont depuis toujours occupé une place importante dans la vie des peuples.

Ainsi l'étude de l'activité biologique et biotechnologique de ces extraits n'a jamais cessé de se développer. Elle a souvent abouti à affirmer les propriétés toxiques antivirale, antibactérienne ou antifongique de ces plantes dans leur intégralité (feuilles, fruits, fleurs, racines et l'écorce).

#### **1. Potentialité larvicide d'une formulation à base d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* issue de différents modes culturels à l'égard des larves L4 de *Culex pipiens*.**

La mortalité observée chez le quatrième stade larvaire de *Culex pipiens* sous l'effet des phytopréparations base d'huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* et du Spinosad montre un effet larvicide plus important selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif  $D1 < D2 < D3$ .

Les études scientifiques montrent que les huiles essentielles peuvent présenter une certaine toxicité. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise. Les huiles essentielles semblent n'être toxiques par ingestion que si celle-ci est faite en de grandes quantités et en dehors du cadre classique d'utilisation. Les huiles ne seront toxiques par contact que si des concentrations importantes sont appliquées (Degryse et al., 2008).

Selon Englebain (2011), les huiles essentielles sont des substances très puissantes et très actives, c'est la puissance concentrée du plant aromatique, il ne faut donc jamais exagérer les doses, quel que soit la voie d'absorption, car toute substance est potentiellement toxique à dose élevée ou répétée. Paracelse a dit: "rien n'est poison, tout est poison, tout dépend de la dose" Il faut également savoir qu'une période trop prolongée provoque l'inversion des effets et fou l'apparition d'effets secondaires indésirables.

De nombreux insecticides sont généralement utilisés comme larvicides pour contrôler *Culex pipiens*, vecteur de la filariose lymphatique. Une étude a été entreprise pour évaluer l'activité larvicide d'extraits de plantes (dont le Romarin) potentiellement actifs sur les larves de *C. pipiens*. Les effets des extraits, éthanoliques et à l'éther de pétrole, ont été évalués in vitro sur le troisième stade larvaire de *C. pipiens*. De façon générale, les extraits à l'éther de pétrole ont été plus efficaces contre les moustiques que les extraits éthanoliques. Parmi tous les extraits testés, celui de *Rosmarinus officinalis* a présenté une efficacité moyenne (Hasaballah, 2015).

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Les HE des plantes ont été proposées comme une alternative prometteuse à l'anti-moustique établi : le DEET (N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide). Une étude a effectué des tests sur des moustiques *Culex pipiens* femelles. Parmi les 9 HE testées, c'est celle du Romarin qui s'est avérée la plus efficace (vitesse de répulsion la plus élevée : 45 mm/min) et elle est aussi beaucoup plus efficace que le DEET. En conclusion, cette étude suggère que 8 des HE testées (dont celle de Romarin) peuvent être utilisées comme contrôle des vecteurs de maladies (par exemple, l'imprégnation des moustiquaires)(**Adams et al** .,2016).

Nos résultats rejoignent ceux **d'Aounty et al.** (2006) ,les concentrations minimales nécessaires pour obtenir 100% de mortalité est de 0,05g/ml pendant 48h pour l'huile essentielle de *R.officinalis*, entre autre, la concentration de 2,44g/ml l'extrait aqueux de *R.officinalis* provoque une mortalité de 91,30% au bout de 48h, ces résultats se rapproche de celle trouvés par **Aounty et al.** (2006) qui ont étudié l'activité larvicide des extraits de 5 types de plantes sur *Culex pipiens* Concernant la composition biochimique des extraits testés, L'huile essentielle de *Rosemarinus officinalis* est caractérisée par une teneur élevée en 1-8 Cineole et le  $\alpha$  pinène(**Atik bekkara et al.**, 2007), L'extrait aqueux de la même plante qui s'est avérée moins toxique est riche en flavonoïdes et en acide Rosemarinique (qui est un acide phénol), l'activité intéressante de ces molécules chimiques avait déjà été mise en évidence lors d'une évaluation antivirale et antibactérienne par **Hoefler**, (1994).

En plus de la présence de grandes teneurs en 1-8 Cineole dans l'huile essentielle du romarin, l'efficacité de celle-ci est expliquée par une modification chimique : des processus d'oxydoréduction lors de l'hydrodistillation transformant les molécules aromatiques et créant ainsi de nouveaux principes actifs, pour cela les huiles essentielles seront donc plus actives mais également plus toxiques que tout produit végétale (**Jacteur**, 2006).En effet, **Hasni et Zeghba** ,(2017) ont montré que l'huile essentielle de *R.officinalis*ont occasionné respectivement 33.36% ,60%, 70%, 86.69 % de répulsion vis-à-vis des adultes de *Rhyzopertha dominica*. Ceci montre clairement que le pourcentage de répulsion augmente en fonction de la dose (1, 2, 3 et 4  $\mu$ l) l'effet le plus remarquable est enregistré avec la dose 4  $\mu$ l.

Selon **Ndomo et al.** (2009), rapportent qu'après deux heures d'exposition, les différentes doses de huiles des feuilles de *Callistemon viminalis* (de 0.031 à 0.25 $\mu$ l) ont occasionné une répulsion dont le taux varie de 36.6 à 80 % vis –à-vis des adultes d'*A. obtectus* ,ceci montre clairement que le pourcentage de répulsion augmente en fonction de la dose.

cependant une meilleure efficacité générale des huiles des *R. tournefortii* confirmant ainsi les précédents résultats obtenus sur ces deux différentes espèces (**Gachkar et al.**, 2007; **Dahmane et al.**, 2010; **Okoh et al.**, 2010; **Beneddouché et al.**, 2011; **Monika Sienkiewicz et al.**, 2013; **Takia Lograda et al.**, 2014; **Tahri et al.**, 2015) , ces mêmes auteurs attribuent ces différences d'activités d'huiles essentielles à leurs différences de teneurs en composés majoritaires actifs.

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Nos résultats a été prouvé par (**Menaceur**, 2016), le travail étudie la composition chimique et l'activité insecticide in vitro des huiles essentielles des feuilles de *Rosmarinus tounefortii* De Noé et *Lavandula stoechas* L..

### 2. L'activité antioxydante des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tounefortii* sous l'effet de différents stimulateurs.

L'activité antiradicalaire est élevée pour l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et modérée pour l'huile essentielle de *Rosmarinus tounefortii*.

En comparant les résultats obtenus, l'activité antioxydante est classée suivant l'ordre : Vitamine C > *Rosmarinus officinalis* > *Rosmarinus tounefortii*.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle est censée être principalement en raison de leurs propriétés redox, qui jouent un rôle important dans l'adsorption et la neutralisation des radicaux libres ou en décomposition des peroxydes (**Moghaddam et al.**,2011).

Les résultats obtenus concernant l'activité antioxydante des huiles essentielles des deux plantes étudiées évaluée in vitro par de DPPH, il ressort que les deux huiles essentielles testées possédaient des propriétés de piégeage de radicaux libres, avec l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* étant plus efficace que celle de *Rosmarinus tounefortii*, ce qui est confirmé par (**Aouadi et al.** ,2014).

Les différences trouvées dans les études de l'activité antioxydante peuvent être en rapport avec la méthode utilisée pour extraire les composés antioxydants, la méthode d'évaluation et la nature hydrosoluble ou liposoluble de l'antioxydant (**Gachkar et al.**,2007 ; **Kuliscic et al.**,2004 : **Ghedadba et al.**,2014).

L'activité antioxydante peut varier aussi, selon la composition chimique des huiles essentielles (**Derwich et al.**,2011).

**Jordan et al.** (2013) , ont étudié l'effet de stades phénologiques sur la composition chimique et l'activité antioxydante de l'huile essentielle du romarin.

Nos résultats rejoignent ceux de (**Gachkar et al.**,2007) qui attestent que l'huile essentielle du romarin est moins performante par rapport aux antioxydants standards. **Wang et al.**(2011), ont constaté quant à eux l'efficacité antiradicalaire de celle-ci avec un taux d'inhibition de  $62,45 \pm 3,42\%$ , (cette valeur reste tout de même inférieure à celle de la Vit C qui est de  $86,93 \pm 3,21\%$ ). Ces derniers résultats, rejoignent ceux de **Kadri et al.** (2011) , qui ont trouvé une EC50 égal à 110,20 µg/ml, ce qui est trois fois supérieur à celui du BHT, l'antioxydant synthétique dont l'EC50 est de 40,5 µg/ml.

Les travaux de **Martins et al.** (2012), rapportent l'importance des huiles essentielles comme des antioxydants naturels.

De nombreuses recherches ont montré une corrélation positive entre les activités antiradicalaires et les composés phénoliques (Santos-Sanchez et al.,2014).

De même, La faible activité antioxydante de l'huile essentielle du romarin comparativement à d'autres huiles connus par leur activité antioxydante importante tels

## CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

que les huiles essentielles d'argan, le thym et le girofle, est due à l'absence des composés phénoliques tels que le thymol, le carvacrol et l'eugénol (**Kulisic et al.**, 2004).

Selon **Kadri et al.** (2011), les monoterpènes oxygénés et le mélange de monoterpènes et des sesquiterpènes hydrocarbures sont principalement responsables du potentiel antioxydant des huiles essentielles par leur capacité d'agir comme donateurs d'atomes d'hydrogènes ou d'électrons, d'où la transformation réductive de DPPH• en DPPH-H, et par conséquent la formation de la coloration jaune.

La capacité de balayage de radical libre DPPH par l'huile essentielle du romarin peut être attribuée à la présence de certaines composants qui ont une activité anti-oxydante, par exemple, 1,8-cinéole,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, camphre,  $\alpha$ -thujone et  $\beta$ -thujone (**Jalali-Heravi et al.**, 2011).

Dans une étude antérieure, (**Gachkar et al.**, 2007), ont démontré que les huiles avec une prédominance monoterpénique ont montré une activité antioxydante assez modeste.

En revanche, d'après les travaux de **Tepe et al.**, (2004), ont montré une grande activité antioxydante des huiles essentielles contenant des monoterpènes et/ou des sesquiterpènes oxygénés. Ainsi une corrélation existe entre l'activité antioxydante des essences et la teneur des monoterpènes oxygénés (**Miladi et al.**, 2013).

## Conclusion

### Conclusion

Les plantes aromatiques possèdent de plus en plus un atout considérable grâce à la valorisation de leurs huiles essentielles dans différentes applications notamment en tant que anti-inflammatoires, antiseptiques, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides et insectifuges, tonifiantes, stimulantes, calmantes. Ce travail rapporte la valorisation, en tant que bio insecticide et anti oxydant, de deux huiles essentielles de deux plantes de la famille lamiacée (*Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii*).

Les résultats de cette étude se sont révélés, pour l'ensemble des traitements, que la fluctuation temporelle des mortalités corrigées et observées des larves L4 de *Culex pipiens* enregistrent des mortalités plus imposant selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif  $D1 < D2 < D3$  pour l'huile essentielle formulée et le Spinosad .

Sous l'effet des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* formulées, l'activité larvicide du principe actif s'accroît graduellement dans le temps. Elles affichent des mortalités importantes après 1h 30min d'exposition. En revanche, le Spinosad, affiche des mortalités tardives visibles dès 2h. La vision globale des potentialités larvicides engendrent des mortalités corrigées très similaire pour les deux espèces du romarin.

L'activité antioxydante a été évaluée par le test de piègeage du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH). Les résultats montrent que les huiles essentielles testées ont une faible activité antioxydante comparées à l'antioxydant standard (vitamine C).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abraham I, El Sayed K, Chen ZS, Guo H.** 2012 ,Current status on marine products with reversal effect on cancer multidrug resistance.; 10 :p. 2312–2321.

**Aissaoui,L.**2014-Etude ecophysiologique et systématique des Culicidae dans dans la région de Tébessa et lutte biologique.these Doctorat .Université Badji Mokhtar Annaba.Faculte des Science Departement de biologie. p 187.

**Amraoui,F.**2012-Le moustique Culex pipinens ,Vecteur potentiel des virus west NILEETfièvre de la valle de Rift dans la région du Maghreb .these doctorat.Univ.Mohammed V Agdal.Fac.Sci.Rabat. p105.

**Andreo V.,** 2003. L'effet anti-gorgement sur un chien d'un shampoing a 0,07% de Deltamethrine sur un moustique du Complexe Culex pipiens, Thèse de Médecine Vétérinaire, Toulouse : p170.

**Aouadi D., Giuseppe L., Valentina V., Nasri S., Daniela M. R. B., Abidi S., Priolo A. & Ben Salem H.,** 1997“The antioxidant status and oxidative stability of muscle from lambs receiving oral administration of Artemisia herba alba and Rosmarinus officinalis essential oils”, Meat Science, V. 97, p :237-243.

**Aouati A.,** 2009. Inventaire des culicidae des zones humides et des forêts de chêne-liège. Caractérisation systématique par les profils des hydrocarbures cuticulaires. Essais de lutte. Thèse de Magistère, Université Badji Mokhtar, Annaba: p 131.

Athamena.S ; 2009. « Etude quantitative des flavonoïdes des graines de cyminum et les feuilles de Rosmarinus officinalis et l'évaluation de l'activité biologique »; thèse de magistère ; université d'El hadj Lakhdar de Batna p94.

**Balenghien T.,** 2006. De l'identification des vecteurs du virus WestNile à la modélisation du risque d'infection dans le sud de la France.Thèse de Doctorat, Grenoble, Université J. Fourier: p235.

**Basu A., Betts N., Mulugeta A., Tong C., Newman E. et Lyons T.,**2013.« Green tea supplementation increases glutathione and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome ». Nutrition Research 33 (3):p180-197.

**Beloued A.,** 2001- Plantesmédicinalesd'Algérie.Edition: Officedespublicationsuniversitaires : p 88-89.

**Bendali F.,** 2006. Etude bioécologique, systématique et biochimique des Culicidae (Diptera : Nematocera) de la région d'Annaba .Lutte biologique : p26.

**Bensebia O., Barth D., Bensebia B., Dahmani A.,** 2009.*Supercritical CO2 extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modelling. The Journal of supercritical fluids*, vol. 49,.p.161–166.

**Berger M.,** 2006- Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Nutrition cliniqueetmétabolisme. 20 : p.48 – 53.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boelens M.H.**, 1985. The essential oil from *rosmarinus officinalis* L. *Perfumes Flavours*, Vol. 5, N°. 10, p.p. 21–37.
- Bouabida H., Djebbar M. et Soltani N.**, 2012. Etude systématique et écologique des Moustiques (Diptera: Culicidae) dans la région de Tébessa (Algérie). *Faunistic Entomology*, Tébessa, 65 :p. 99-103.
- Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S, et McAnalley B.**, 2003 " Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé", *GlycoScience& Nutrition*. 4(6), p 7.
- Bozin B., Mimica-Duric N., Samojlik I., Goran A. & Igic R.**, 2008 "*Phenolics as antioxydants in garlic (Allium sativum L. Alliaceae)*", *Food Chemistry*, V. 111, p. 925-929.
- Bret B.L., Larson L.L., Schoonover J.R., Parks T.C. and Thompson G.D.**, 1997. Biological properties of spinosad. *Dow to Earth*, 5: p. 6-13.
- Bruneton J.**, 2009, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4e édition revue et augmentée. Paris : Éd. Tec & doc, p 1269.
- Brunhes J., Rhaim A., Geoffroy A., Angel G. et Hervy J.P.**, 1999. Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne : Programme d'identification et d'enseignement. Ed.IRD, Montpellier, ISBN 2,7099 :p. 1446-8
- Brunhes J., Rhaim A., Geoffroy B., Angel G. et Hervy J.P.**, 1970. Les Culicidae d'Afrique méditerranéenne. Logiciel de l'Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D.), Montpellier, ISBN 2,7099 :p. 1446-8.
- Brunhes J., Rhaim 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 : p.1446-8.
- Cachereul A.**, .1997: Les moustiques : cycle de développement, aspects anatomophysiologiques et régulation du cycle ovarien, Thèse de Médecine Vétérinaire, Nantes, p117.
- Candace A., SOUSA, RICHARD E.W. HALLIWELL.**, 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, p.233- 2327.
- Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. Am J Clin Nutr** 2000; 71 (suppl):p. 621S-9S.
- Clement A.N.**, 1999. *The Biology of Mosquitoes: Sensory Reception and Behaviour*. CAB International Publishing: p576.
- Clément, L., Engonga, O.**, (2009). Etude phytochimique , activités antimicrobiennes et antioxydantes de quelques plantes p589.
- Cook D.R.**, 1974. Water mite genera and subgenera. *Mem. Am. Entomol. Inst.*, 21: p 860.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cragg GM, Boyd MR, Cardellina II JH, et al.** 1993. Role of plants in the National Cancer Institute drug discovery and development program. In : Kinghorn AD, Balandrin MF, eds. Human medicinal agents from plants, chapter 7. ACS Symposium Series 534,
- Cseke et Kaufman.**, 1992: Apparatus for the determination of volatile oil. J. Amer. Pharm. Assoc., Vol. 17, pp : 336-341.
- Derwich E., Benziane Z., Chabir R. & Taouil R.**, 2011. "In vitro antibacterial activity and gc/ms analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown IN Morocco", Int. J. Pharm. Pharm. Sci., V. 3, n°3, p 8995.
- Direction Européenne de la qualité du médicament et soins de santé (deQm).**, 2013 Pharmacopée Européenne 8.0. Tome I. 8è édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe, p 1568.
- DowElanco.**, 1994. Spinosad technical guide., Indianapolis, p45.
- Edwards F.W.**, 1941. Mosquito of the Ethiopian Region, part III: Culicinae adult and pupae, Brit. Mus. Nat. Hist., London : p499.
- Euzeby J.**, 2008. Grand dictionnaire illustre de parasitologie medicale et veterinaire. Paris: Editions Tec. and Doc.: p 818.
- Faraj C., Elkholi M. et Lyagoubi M.**, 2006. Cycle gonotrophique de *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae), vecteur potentiel du virus West Nile, au Maroc : estimation de la durée en laboratoire. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 99 : p119-121.
- Favier A.** 2003 "Le stress oxydant. Interet conceptuel et experimental dans la comprehension des mecanismes des maladies et potentiel thérapeutique". L'actualité chimique.:p108-115.
- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M. B., Taghizadeh M., Astaneh S. A. & Rasooli I.**, 2007 "Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils", Food Chem., V. 102, p 898-904.
- Gargan, T.P., C.L., Higbee, G.A., A., El said , s .**, 1983 -the effet of laboratory colonization on the vector phathogen interactions of Egyptin *Culex pipiens* and Rift valley fever virus. Am.j.Trop.Med .Hyg.32:p1154-1163.
- GARNERO J.**, 1996 : Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur K345 :p 1-45.
- Gashen H.**, 1932. Influence de la température et de la diminution larvaire sur ledéveloppement de *Culex pipiens* (race autogène). Bull. Soc. Path. Exot., 25 : p577-581.
- Ghedadba N., Bousselfela H., Hambaba L., Benbia S. & Mouloud Y.**, 2014 "Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L", *Phytothérapie*, V.12 :p15-24.
- Gilly G.**, 2005. Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse: botanique, culture, chimie, production et marché. Ed. Le Harmattan, Paris, p405

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Guillermet C.**, 2013. Les moustiques. L'entomologie à l'île de la Réunion, p708.
- Hadi M.**, 2004 « La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; étude et application thérapeutique ». Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'université Louis Pasteur Domaine : Pharmacochimie .155p.
- Hamer G.L., Kitron U.D., Brawn J.D., Loss S.R., Ruiz M.O., Goldberg T.L. and Walker E.D.**, 2008. *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) : a bridge vector of West Nile virus to humans. *Journal of Medical Entomology*, janvier, 45 : p125-128.
- Hammaidia, H.** 2004-Inventaire et biodiversité des Culicidae (Diptera-Nematocera) dans la région de souk-Ahras et Tebbassa (Algérie). Thèse de magistère université de Constantine Algérie. p180.
- Herrero R., Asins M.J., Pina J.A., Carbonell E.A. and Navarro L.**, 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theoretical and Applied Genetics*. 93:p 1327-1334.
- <http://www.afnor.org/liste-des-actualités>.
- Jalali-Heravi M., Moazeni R. S. & Sereshti H.**, 2011. "Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics", *Journal of Chromatography A*, V. 76, p2569.
- Jordan M. J.**, 2013. Vanesa L., María C. R., Susana L. & José A. S., "Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L", *Food Control*, V. 30, p 463-468.
- Kadri A., Ben Chobba I., Zarai Z., Bekir A., Gharsallah N., Damak M. & Gdoura R.**, 2011 "Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from aerial parts of *Artemisia herba-alba* grown in Tunisian semi-arid region", *Afr. J. Biotechnol.*, V. 10, n°15, p2923-2929.
- Kadri A., Zarai Z., Chobba B., Bekir A., Gharsallah N., Damak M. & Gadoura R.**, 2011 "Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from south-western of Tunisia", *J. Med. Plants Res.*, V. 5, n°29, p 6502-6508.
- KETTLE D.S.**, 1995: *Medical and Veterinary Entomology*, 2<sup>o</sup> édition, Wallingford: CAB international, 1995, p 725 .
- Khefifi, H. S.**, 2015. Etudes physiologiques et génétiques de caractères morpho-physicochimiques des fruits d'agrumes au cours de la maturation jusqu'à l'abscission. montpellier.france. p18-31.
- Knight K.L. and Stone A.**, 1977. *A Catalog of the World. (Diptera : Culicidae)*, The Thomas Say Foundation, Vol. 6, 2<sup>e</sup>me édité., publié par l'Entomological Society of America, Maryland : p 611.
- Koechlin-Ramonatoxo C., 2006 : Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr Clin Metab* ; 20(4) : p165–777.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Krida, G., Diancourt, L., Bouattour, A., Rhim, A., Chermiti, B. & Failloux, A. B.** 2011- Assessment of the Rift valley fever virus in the moustique *Culex pipiens*. *bull. Soc-pathol. exot.*, 104(4):p250-259.
- Kulisic T., Radonic A., Katalinic V. & Milos M.**, 2004 "Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil", *Food Chem.*, V. 85, p 633-640.
- Laurent D., Pauillac S., Chinain M.** Utilisation de l'acide rosmarinique et de ses dérivés pour traiter le ciguatéra [en ligne]. Disponible sur : (consulté le 22/06/2021).
- Lien EJ, Ren S, Bui HH, Wang R** 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med* ; 26 : p 285-94.
- Linné C.**, 1758. *Systema naturae per regna tria naturae*. Edition 10. Holmia, 1: p 82.
- Lobo V., Patil A., Phatak A., & Chandra N.**, 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4(8) : p 118–126.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L.** 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 79, N°. 5, p. 727-747
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L.** 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 79, N°.2, p56.
- Marinova G. & Batchvarov V.**, 2011. "evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH", *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, V. 17, n°1, p11-24.
- MARTINS M. R., Tinoco M. T., Almeida A. S. & CRUZ-MORAIS J.**, 2012. "chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three essential oils from portuguese flora", *Journal of Pharmacognosy*, V. 3, n°1, p 39-44.
- Messai N., Berchi S., Boulkenafed F. et Louadi K.** 2012. Inventaire systématique et diversité biologique de Culicidae (Diptera : Nematocera) dans la région de Mila (Algérie). *Faunistic Entomology*, 63(3) : p 203-206.
- Miladi H., Ben Slama R., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A. & Ammar E.**, 2013 "Chemical composition and cytotoxic and antioxidant activities of *Satureja montana* L. essential oil and its antibacterial potential against *Salmonella spp.* Strains", *Journal of Chemistry*, p9.
- Milpied H.**, 2009. "Progrès en dermato-allergologie", Edition John Libbey EUROTEXT, p128.
- Moghaddam A. M. D., Shayegh J., Mikaili P. & Sharaf J. D.**, 2011. "Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria", *J. Med. Plants Res.*, V. 5, n°15, 3453-3456.
- Molyneux P.**, 2004. "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarini", *J. Sci. Technol.*, V. 26, n°2, p 211-219.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Moutailler,s.,Krida,G.,schaffner,F.,vazeille,M.&Failoux,A.B.**2008-potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region.vector Borne zoonot Dis.,8:p 749-753.

**OMS.** 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides, (Page consultée le 20/05/20201). [en ligne]. Adresse URL : [www.who/cds/whopes/gcdpp/2005.13](http://www.who/cds/whopes/gcdpp/2005.13).

**OMS.,** 2015. La Filariose lymphatique: entomologie pratique : manuel à l'intention des programmes nationaux :p 92.

**Oshaghi M.A., Ghalandari R., Vatandoost H., Shayeghi M., Kamali-nejad M., Tourabi-Khaledi H., Abolhassani M. and Hashemzadeh M.** 2003. Repellent Effect of Extracts and Essential Oils of Citrus limon (Rutaceae) and Melissa officinalis (Labiatae) Against Main Malaria Vector, Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae). Iranian J Publ Health, Vol. 32, No. 4 : p 47-52.

**Palmisano,L.,Giuliano,M.,Nicsastri,E.,Pirillo,M.F.,Andreotti,M.,Galluzzo,C.M.,Bucciardini,R.,Fragola,V.,Andreoni,M.,Vella,S.**2005-Residual Viraemia in subjects with chronic HIV infection and viral load <50 copies /ml:the impact of highly active antiretroviral therapy.19(16):p 7-1843.

**Pelikan J.,** 1986. Matière première du règne végétal. Ed. Masson Et Cie, Tome 2, paris, 2343 p.

**Petit S., Gogny M., Martel J.L., Pellerin J.L., Pinault L., Pouliquen H., Puyt J.D.,and Vandaele E.** 2009. Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2009. 15ème édition. Rueil-Malmaison : Editions du Point Vétérinaire : p 1808.

**Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J.O.,** 1998 « Mesure et utilisation des antioxydant en médecine humain ». MS. p 73.

**Popovici C., Ilonka S. & Bartek T.,** 2009 "Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH", Revue de génie industriel, V. 4,p 25-39 .

**Prior RL, Cao G.,** 1999.In vitro total antioxidant capacity : comparison of different analytical methods. Free RadicBiol Med ; 27 : p1173-81.

**Quezel P., Santa S.,** 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris, CNRS, Tome 1 et 2, p1170.

**RameauJ-C.,** 2008. Flore forestière française: Région méditerranéenne, p71.

**Reusken,C.,De vries,A.,Ceelen,E.,Beetwkes,j.&Scholte,E.J.**2011-A Study of west Nile virus ,sindbis virus Batai virus and Usutu virus in mosquitos in a potential high-risk area for arbovirus circulation in the Netherlands De Oostvaardersplassen.Eur.Mosquito bull.,29:p 66-81.

**Rioux J.A.,** 1958. Les Culicides du Midi » méditerranéen. Etude systématique et écologique. Encyclopédie entomologique, XXXV. Editions P. Lechevalier, Paris : p 303.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rioux J.A., Golvan Y.J., Croset H., Tour S., Houin R., Abonnec E., Petitdidier M., Volhardt Y., Dedet J.P., Albert J.L., Lanotte G. and Quilici M.,** 1965. Epidémiologie des leishmanioses dans le Sud de la France. Paris : Ed INSERM ; Montpellier INSERM ; (37) : p 223.
- Rodhain F., Perez C.,** 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Paris: Maloine : p 458.
- Romi R., Proietti S., Di-Luca M. and Cristofar M.,** 2006. laboratory evaluation of the bio insecticide spinosad for mosquito control. Journal of american mosquito control association, 22 : p 93-96.
- Salgado V.L.,** 1998. Studies on the mode of action of spinosad : insecte symptoms and physiological correlates. Pesticide Biochemistry and physiology, 60 : p 91-102.
- Santos-Sanchez N. F., Flores-Parra A., Valadez-Blanco R., Fernandez-Rojas B., Martinez-Vasquez J. B. & Salas-Coronado R.,** 2014 “ Polyphenolic content, free radical scavenging activity and isolation of Tiliroside from *Heliocarpus terebinthinaceus* (Tiliaceae) Seeds”, Journal of Biological Sciences, V. 14, n°5, p 376-380.
- Schaffner E., Angel G., Geoffroy B., Hervy J.P., Rhaïem A. and Brunhes J.,** 2001. Les moustiques d'Europe : logiciel d'identification et d'enseignement Paris (FRA) ; Montpellier : IRD ; EID, 2001, 1 CD ROM (Didactiques). ISBN 2-7099-1485-9.
- Scheler A.,** 1862. Dictionnaire d'étymologie française d'après les résultats de la science, p84.
- Scherer R. & Godoy H. T.,** 2009. “Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method”, Food Chemistry, V. 112, (2009), p 654-658.
- Schneider A.,** 2002. *Arbres et arbustes thérapeutiques* : les connaître, les protéger, les utiliser. Montréal : Ed. De l'Homme, 2002, p 384.
- Scimeca, D., et TETAU, M.,** 2005 «Votre santé par les huiles essentielles», p 55.
- Seguy E.,** 1923. Les moustiques de France. Ed. Paul Lechevalier, Paris: p 225.
- Snodgrass R.E.,** 1959. The anatomical life of the Mosquito. Smiths. misc. Coll., 139 (8) : p 87.
- Staub H., Bayer L.,** 2013 Traité approfondi de phyto-aromathérapie : avec présentation de 750 huiles essentielles connues. Paris : Grancher, p 685.
- Storad C.J.** 1990; Cures from the deep. Arizona State 22–26. 3. Chapman AD. Numbers of living species in Australia and the world, 2nd ed. Canberra, Australia : Report for the Australian Biological Resources Study, 2009 : 84 p. 4. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod 2012 ; 75 : p 311–335.
- Szabo M. R.,** 2007. Iditoiu C., Chambre D. & Lupea A. X., “Improved DPPH determination of antioxidant activity spectrophotometric assay”, Chem. Pap., V. 61, n°3, p 214-216.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., Vardar-Unlu G., Polissioud M. & Sokmen A.**, 2004 .“Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl)”, Food Chem., V. 84, n°4, p 519-525.

**Teuscher E., Anton R., Lobstein A.**, 2005. *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Ed. Lavoisier, Paris, p 522.

**Tine-Djabbar,F.**2009-bioecologie des moustiques de la region de tebbessa et evaluation de deux regulateur de croissance(halophenozide et methoxy fonozide )a`l egard de deux espece de moustique Culex pipines et Culiseta longiareolata ; toxicologie ,morphometrie,biochimie et reproduction.these de doctorat.Fac .Sci.Univ.Annaba,Algerie.p186.

**Tomlin C.**, 2000. The pesticide manual.12th ed. British Cro Protection Council, London, United Kingdom.

**Toral Y. and Caro M.**, 2005.Evaluation in vitro de l'efficacité du fipronil sur Culex pipiens pipiens. Th. : Med.Vet. : Toulouse, 099 : p 53.

**Toral Y. and Caro M.**, 2008.Evaluation in vitro de l'efficacité du fipronil sur Culex pipiens pipiens. Th. : Med.Vet. : Toulouse, 099 : p 58.

**Wallig,A. ,et Klein,P.**, 2002. « Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay », J. Agric. Food Chem., vol. 50, no 18, p. 5053–5057.

**Wang K. J. & Ning L.**, 2007.“Antioxidant Phenolic Compounds from Rhizomes of *Curculigo crassifolia*”, Arch. Pharm. Res., V. 30, n°1, p 8-12.

**Wang R., Zhang J., Chen S., Lu M., Luo X., Yao S., Liu S., Qin Y. & Chen H.**, 2011 “Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression”, Lung Cancer, V. 74, p 188-196.

**Wichtl M., Anton R., Lassechere-Bernard M.** ,2003.*Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. 2e éd. française (4e éd. allemande). Paris : Tec [et] Doc, p692.

**Yadav, R. Kumari, A. Yadav, J. P. Mishra, D. S. Srivastava, et S. Prabha**, 2016 « *Antioxidants and its functions in human body - A Review* », Res. Environ. Life Sci., vol. 9, p. 1328-1331