

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI - Laghouat -
Faculté des Sciences
Département des Sciences Agronomiques

جامعة عمار ثليجي - الاغواط -
كلية العلوم
قسم العلوم الفلاحية



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

*En vue de l'obtention du diplôme de Master en Agronomie
Option : Protection Des Végétaux et d'Environnement*

Thème

**Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique des
huiles essentielles de trois plantes aromatiques sur la
croissance des champignons phytopatogènes**

Présenté (e) par : **TELIDJI Hanifa**

Le : 23/06/2014

Encadré (e) par : **Mr HOUICHER Abderrahmane ; Maître-assistant A**

Remerciements

Tous nos remerciements vont d'abord à notre DIEU le tout puissant, pour nous avoir donnée la force et la patience.

فاللهم لك الحمد كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mr HOUICHER A, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail, merci de m'avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit ; je ne peux, Monsieur, que sincèrement vous exprimer mon respect et mon gratitude.

Je remercie également a ma très grande considération, et mon profond respect au *Madame* TOUATI Siham *et Monsieur* BOUKEROUIS Djoudi d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Un grand merci à toutes et à tous pour votre aide!

DEDICACE

Avec l'aide de dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie A :

A les personnes le plus chères au monde mes chers parents source de tendresse et de courage ;

A Mes très chers frères : Fares, Mouhamed, Ammar et Taher que dieu le bénisse ;

A Mes très chers sœurs : Selma et Aida ;

A La mémoire de ma très chère tante FARIDA qui laissé un grande vide a ma vie ;

A Mes oncles: Said, Saddik, Djamal, Ammar;

A Mes tantes: Hayat, Nawal, Fatma, Habiba, Zhor ;

A La famille: Teldji, Bouzar, Boufaneya, Boutbakh ;

A Mes amies;

A Mes collègues ;

Sans oublier les flashes anime de ma petite perle LIMAR.

A ceux, qui me sont chers, Je dédie ce travail.

Table des matières

Résumé		
Liste des abréviations		I
Liste des tableaux		II
Liste des figures		III
INTRODUCTION		1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE		
1. Les huiles essentielles		3
1.1. Localisation des huiles essentielles dans les plantes aromatiques		3
1.2. Procédés d'extraction des huiles essentielles		5
1.2.1. Distillation par entrainement à la vapeur		5
1.2.2. Hydrodistillation		6
1.2.3. Expression à froid		7
1.2.4. Extraction au CO₂ supercritique		7
1.3.Composition chimique des huiles essentielles		8
1.3.1. Les terpènes de formule(C ₅ H ₈) n.....		8
1.3.2. Les composés aromatiques biosynthétisés.....		9
1.3.3. Les composés divers.....		9
1.4.Paramètres influençant la composition des huiles essentielles		9
1.4.1. Facteurs intrinsèques		9
1.4.2. Facteurs extrinsèques		10
1.5.Toxicité des huiles essentielles		10
1.6.Activités biologiques des huiles essentielles		11
1.6.1. Activité antibactérienne		11
1.6.2. Activité antiviral		12
1.6.3. Activité antifongique		12

1.7. Les plantes aromatiques sélectionnées pour cette étude.....	13
1.7.1. <i>Laurus nobilis</i> L.....	13
1.7.2. <i>Mentha spicata</i> L.....	14
1.7.3. <i>Thymus vulgaris</i> L.....	15
2. Les champignons phytopathogènes.....	17
2.1. Principaux genres phytopathogènes.....	17
2.1.1. Le genre <i>Aspergillus</i>	18
2.1.2. Le genre <i>Penicillium</i>	19
2.1.3. Le genre <i>Fusarium</i>	20
2.2. Facteurs de développement des champignons.....	21
2.3. Les problèmes phytosanitaires liés à ces agents phytopatogènes.....	22
2.3.1. Les maladies	22
2.3.2. Mycotoxines.....	23
2.4. Lutte contre les moisissures phytopathogènes.....	24
2.4.1. Lutte physique.....	25
2.4.2. Lutte chimique.....	26
2.4.3. Lutte biologique.....	27
PARTIE EXPERIMENTALE	
1. Matériels et méthode.....	29
1.1. Matériel fongique.....	29
1.2. Matériel végétale.....	29
1.2.1. Procédé d'extraction des huiles essentielle.....	30
1.2.2. Calcul du rendement.....	31
1.2.3. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles.....	31
1.3. Détermination de la CMI et CMF.....	31
1.3.1. Préparation des dilutions de l'agent antifongique.....	31
1.3.2. Préparation des tubes CMI de l'agent antifongique.....	33
1.3.3. Préparation des suspensions fongique.....	34
1.3.4. Inoculation des tubes CMI.....	34
1.3.5. Incubation et lecture.....	35

1.3.6. Détermination de la CMF.....	35
2. Résultats et discussion.....	36
2.1. Rendement et composition chimique des huiles essentielles.....	36
2.2. Effet antifongique des huiles essentielles.....	40
CONCLUSIONS.....	47
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	49
ANNEXES.....	64

Thème : « Détermination *in vitro* de l'activité antifongique des huiles essentielles de trois plantes aromatiques sur la croissance des champignons phytopathogènes »

Résumé

Cette étude a pour objectif de déterminer *in vitro* l'effet antifongique des huiles essentielles de *Laurus nobilis*, *Mentha spicata* et *Thymus vulgaris* sur la croissance de six champignons phytopathogènes. Les huiles essentielles de *M. spicata* et de *T. vulgaris* sont caractérisées par la présence de carvone (52.23%) et de linalool (78.06%), respectivement ; tandis que l'huile de *L. nobilis* a montré une dominance de 1,8-cinéole (45.58%). De plus, les résultats de l'activité antifongique montrent que l'huile essentielle de *M. spicata* a exercé une forte activité fongicide contre les six champignons testés, comparée à l'essence de *T. vulgaris* et de *L. nobilis*. *Fusarium graminearum* et *Penicillium expansum* sont les espèces les plus sensibles aux huiles essentielles utilisées, par contre *Aspergillus niger* a montré une résistance considérable à l'égard de l'huile de *Thymus vulgaris* (> 20 µl/ml). L'étude présente également un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire car elle propose l'utilisation des huiles essentielles comme des biofongicides afin de réduire la dépendance des fongicides synthétiques et de garantir une meilleure production agricole.

Mots-clés : *Mentha spicata* ; *Thymus vulgaris* ; *Laurus nobilis* ; Huile essentielle ; Activité antifongique.

«In vitro determination of antifungal activity of three aromatic plants essential oils on the growth of phytopathogen fungi »

Abstract

The aim of this study was to determine *In vitro* the antifungal effect of essential oils from *Laurus nobilis*, *Mentha spicata* and *Thymus vulgaris* on the growth of six phytopathogen fungal strains. The essential oils of *M. spicata* and *T. vulgaris* oils are characterized by the presence of carvone (52.23%) and linalool (78.06%), respectively, while *L. nobilis* oil showed a dominance of 1,8-cineole (45.58%). In addition, the antifungal activity results showed that *M. spicata* essential oil exerted strong antifungal activity against the six tested fungi, as compared to *T. vulgaris* and *L. nobilis*. *Fusarium graminearum* and *Penicillium expansum* were the most sensitive to the activity of these oils, whereas *Aspergillus niger* showed a considerable resistance against *Thymus vulgaris* oil (> 20 µl / ml). The present study presents also a great interest for the food industry because it proposes the use of essential oils as biofungicides in order to reduce dependence on synthetic fungicides and ensure better agricultural production.

Key words: *Mentha spicata*; *Thymus vulgaris*; *Laurus nobilis*; Essential oil; Antifungal activity.

"تحديد النشاط المضاد للفطريات في المختبر للزيوت الأساسية المستخلصة من ثلاثة نباتات عطرية على نمو الفطريات الممرضة"

ملخص

تهدف هذه الدراسة لتحديد النشاط المضاد للفطريات في المختبر للزيوت الأساسية المستخلصة من ثلاث نباتات عطرية (الرند *Laurus nobilis*, النعناع *Mentha spicata* والزعتر *Thymus vulgaris*) ضد نمو ستة فطريات ممرضة للنباتات. المكونات السائدة لزيوت النعناع و الزعتر هي بالتتابع الكارفون (52.23%) و لينالول (78.06%) في حين اظهر زيت الرند هيمنة 1,8- سينول (45.58%). نتائج النشاط المضاد للفطريات للزيوت الأساسية يبين أن زيت النعناع اظهر نشاط فعال ضد الفطريات الستة المختبرة، بالمقارنة مع مستخلص الزعتر و الرند. بالإضافة إلى ذلك كان *Fusarium graminearum* و *Penicillium expansum* الصنفان الأكثر تأثر لفاعلية هذه الزيوت في حين *Aspergillus niger* اظهر مقاومة كبيرة اتجاه زيت الزعتر (< 20 µl/ml). تقدم هذه الدراسة أيضا فائدة كبيرة للصناعات الغذائية، لأنها تتصح باستخدام الزيوت الأساسية كمبيدات فطرية طبيعية للتقليل من استعمال المبيدات الفطرية الاصطناعية وضمان إنتاج زراعي جيد.

الكلمات المفتاحية: النعناع *Mentha spicata*; الرند *Laurus nobilis*; الزعتر *Thymus vulgaris*; زيت أساسي; نشاط مضاد للفطريات.

Liste des abréviations

AOC : Appellation d'Origine Contrôlée

AW : L'activité d'eau

CAS : Chemical Abstracts Service

CLSI : Clinical and Laboratory Standards

CMF : Concentration Minimal Fongicide

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DL50 : Dose létale

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DO : Densité Optique

FAO: Food and Agriculture Organisation

GC: Chromatographie Gazeux

HE: Huile essentielle

IITA: International Institute of Tropical Agriculture

MOPS: [3-(*N*-morpholino)]-propanesulfonic acide

OMS: Organisation mondiale de la santé

PDA: Patato Dextrose Agar

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Midium

S M : Spectrométrie de Masse

SAB : Sabouraud Dextrose Agar

Liste des tableaux

Tableau n° 1 :	Classification botanique de <i>Laurus nobilis</i>	14
Tableau n° 2 :	Classification de <i>Mentha spicata</i>	15
Tableau n° 3 :	Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i>	16
Tableau n° 4 :	Les principaux mycotoxines dans le monde.....	24
Tableau n° 5 :	Exemples de biopesticides développés pour le contrôle des ennemis et compétiteurs des plantes cultivées	27
Tableau n° 6 :	Origine et période de récolte de matériel végétal.....	30
Tableau n° 7 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> ...	37
Tableau n° 8 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> ..	38
Tableau n° 9 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i>	39
Tableau n° 10 :	Activité antifongique (CMI, CMF) des huiles essentielles de <i>M. spicata</i> <i>T. vulgaris</i> et <i>L. nobilis</i>	41

Liste des figures

Figure n° 1 :	Localisation des structures sécrétrices pour quelques plantes aromatique.....	4
Figure n° 2 :	Extraction par entraînement à la vapeur.....	5
Figure n° 3 :	Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle.....	6
Figure n° 4 :	Schéma du montage de l'expression à froid	7
Figure n° 5 :	Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i>	18
Figure n° 6 :	Caractères du thalle de genre <i>Penicillium</i>	20
Figure n° 7 :	Les cinq approches de la protection des cultures	25
Figure n° 8 :	Dispositif d'hydrodistillation (photo originale).....	30
Figure n° 9 :	Les dilutions de l'agent antifongique insoluble dans l'eau.....	32
Figure n° 10 :	Préparation des tubes CMI de l'agent antifongique insoluble dans l'eau.	33
Figure n° 11 :	Préparation des suspensions fongiques (inoculum) pour la méthode de macro-dilution en milieu liquide.....	34
Figure n° 12 :	Rendement des huiles essentielles.....	36

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les moisissures constituent un agent de détérioration très important. Ils sont omniprésents dans la nature et possèdent un arsenal enzymatique très varié, ce qui leur permet de croître sur divers substrats. Les moisissures diminuent la qualité technologique (taux du gluten) et sanitaire (allergie, agents toxiques responsables de graves intoxications humaines et animales : Mycotoxines), réduisant la valeur nutritionnelle, modifiant l'aspect organoleptique et enfin provoquant des problèmes économiques due aux coûts de détoxification des grains ou les rejets des produits contaminés. Avec la révolution dans le domaine agro-alimentaire, l'être humaine doit maximiser sa production alimentaire afin d'assurer une alimentation adéquate pour la population mondiale. Pour ce faire, il doit réduire l'abondance des espèces qui sont en compétition alimentaire avec eux et mettre ces produits à l'abri de toutes altérations (Khelil, 1977).

En raison de son efficacité et de son application facile et pratique, l'utilisation des produits chimiques constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour lutter contre les moisissures nuisibles (Magan et Olsen, 2004). Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces produits a provoqué une contamination de la biosphère et de la chaîne alimentaire, une éradication des espèces non cibles telles que la faune auxiliaire et l'apparition des microorganismes résistants. La problématique «pesticides » est à la fois d'ordre environnemental avec la contamination de la faune et de la flore, elle est aussi d'ordre sanitaire. En effet, par leurs propriétés toxiques, les pesticides représentent un réel danger pour l'homme lorsqu'ils ne sont pas utilisés dans des conditions appropriées (Fillatre, 2011). Ces dangers ont conduit l'OMS à interdire l'usage de certains fongicides chimiques, d'autres vont être prohibés dans un futur proche (Khelil, 1977).

La tendance actuelle des consommateurs à chercher une alimentation plus naturelle a incité la recherche, le développement et l'application de nouveaux produits naturels ayant des activités antimicrobiennes et antifongiques (Bouguerra, 2012). Il est devenu très indispensable la recherche de molécules nouvelles en prenant en compte d'autres critères que l'efficacité. Cette recherche s'est orientée vers la lutte

biologique par l'utilisation de substances naturelles antibactériennes et antifongiques pouvant constituer une solution alternative aux produits chimiques. Parmi les méthodes de lutte biologique, les biopesticides occupent une place de choix car ils se prêtent souvent à la production de masse requise pour l'industrie et ils s'appliquent avec un pulvérisateur conventionnel ce qui en facilite l'adoption par les producteurs agricoles. Ils sont généralement compatibles avec des méthodes de lutte biologique classiques (ex. lâchers de prédateurs ou de parasites), même s'ils peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes utiles. Les biopesticides peuvent être à base de bactéries, champignons, virus, nématodes et d'extraits de plantes (Giroux *et al.*, 1994; Roger *et al.*, 1995).

Dans ce sens, cette étude a pour objectif de déterminer *in vitro* l'effet antifongique des huiles essentielles de trois plantes aromatiques (*Laurus nobili*, *Mantha spicata* et *Thymus vulgaris*) sur la croissance des champignons phytopathogènes. Elles sont parmi les plantes les plus utilisées dans le monde comme source d'épices et d'extraits à qualité médicale intéressante.

Le présent mémoire est structuré en trois parties. La première s'intéresse à une recherche bibliographique sur les champignons phytopathogènes, les effets néfastes et les différentes méthodes de lutte contre ces champignons et les huiles essentielles avec ses propriétés biologiques ainsi que les plantes aromatiques sélectionnées pour cette étude. La deuxième partie aborde la méthodologie utilisée pour l'extraction et la détermination de la composition chimique des huiles essentielles ainsi la méthode de macro-dilution en milieu liquide utilisée pour l'étude de l'activité antifongique, selon la norme internationale M38-A préconisée par CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). La troisième partie discute les résultats obtenus, enfin nous achevons ce travail par une conclusion générale et des perspectives.

**PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE**

1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur ou des solvants (Smallfield, 2001). Les huiles essentielles (=essence=huiles volatiles) sont : «des produits de composition généralement assez complexe renferment les principes volatils contenu dans les végétaux et plus ou moins modifiés ou cours de la préparation». (Bruneton ,1993).

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc.). Il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante, soit dans les fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rosier), soit dans les sommités fleuries (tagète, lavande), soit dans les feuilles (citronnelle, eucalyptus), ou dans l'écorce (cannelier), ou dans les racines (vétiver), ou dans les fruits (vanillier), ou dans les graines (muscade) ou encore autre part dans la plante (Anton et Lobstein, 2005).

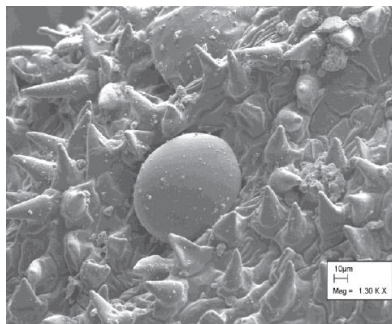
Les huiles essentielles doivent donc être désignées par la dénomination scientifique selon les règles linnéennes : exprimés en latin, le nom de genre, suivie de celui de l'espèce puis l'initiale du botaniste qui l'a décrit la première fois, cela pose problème des descriptions concomitantes, complète éventuellement de la sous espèce ou de la variété, plante puis le mot (Oil) qui rend compte du procédé d'extraction. Par ailleurs, pour une même fraction de plante, en fonction de plusieurs facteurs peut changer notablement, certains voies de biosynthèse sont favorisés et conduisent à des métabolites différents. On distingue pour une même huile plusieurs chémotypes différentes. Il a donc crée une appellation d'origine contrôlée (AOC) pour d'essence (Homsî, 2009).

1.1. Localisation des huiles essentielles dans les plantes aromatiques

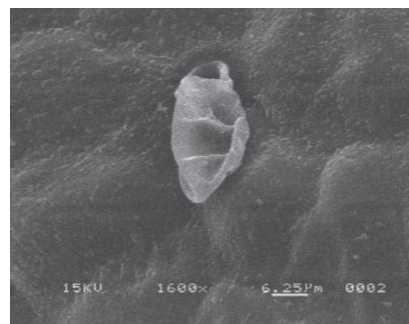
Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement

l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air (Bruneton, 1993 ; Anton et Lobstein, 2005).

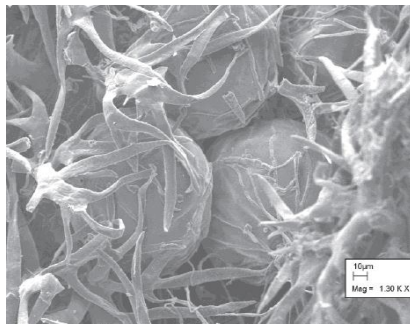
Les huiles essentielles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et se forment dans le cytoplasme de certaines cellules végétales spécialisées (Charabot et *al.*, 1899). Elles peuvent être stockées et emmagasinées dans diverses structures de la plante telles que les poils sécréteurs ou les trichomes, les cellules épidermiques, les cellules sécrétrices internes, les poches sécrétrices et les canaux sécréteurs. La figure n° 1 illustre la localisation des cellules contenant les huiles essentielles pour quelques plantes aromatiques (Loupy, 2006).



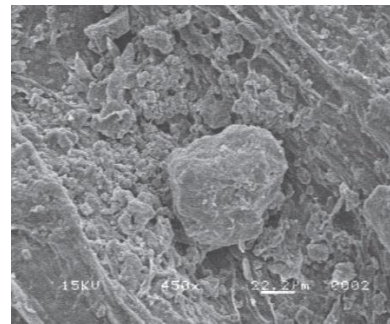
Thym



Menthe



Lavande



Carvi

Figure n° 1: Localisation des structures sécrétrices pour quelques plantes aromatiques (Loupy, 2006).

Parmi les composants majoritaires des huiles essentielles, nous trouvons les terpénoides qui possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopathiques, c'est-à-dire inhibiteur de la germination, mais aussi lors des interactions végétal-animal, comme agent de protection contre les prédateurs tels que les insectes. Ils

interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs (Thompson, Chalchat, Michet, Linhart, 2003; Ormeno, Fernandez et Mévy, 2007).

1.2. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Le procédé d'obtention d'une essence végétale intervient de façon déterminante dans la nature des produits d'extraction. Plusieurs procédés d'extraction des principes végétaux sont connus et utilisés à ce jour, dont l'expression par solvant organique volatil (Bruneton, 1999), l'extraction à l'eau surchauffée (Bruneton, 1999), l'extraction au CO₂ supercritique (Bruneton, 1999), par l'entraînement à la vapeur d'eau et par l'hydrodistillation (Bruneton, 1999). De tous ces procédés, ces derniers sont les plus employés à l'échelle industrielle pour la production d'huiles essentielles (Wang *et al.*, 2008).

1.2.1. Distillation par entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'un des procédés d'extraction les plus anciens et l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles (Cf. figure n° 2). Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un flux de vapeur descendant ou ascendant sans macération préalable. Le plus souvent, de la vapeur d'eau est injecté au bas d'une charge végétale. Les vapeurs chargées en composés volatils sont condensées avant d'être décantées et récupérées dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles) (Crouzet, 1996 et Peyron, 1992).

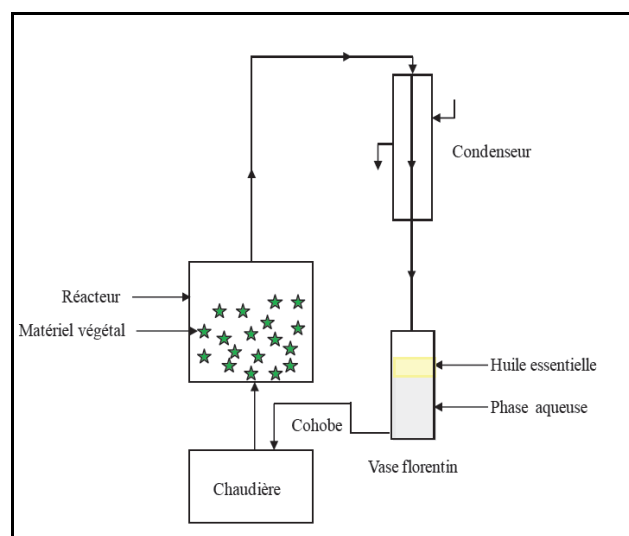


Figure n° 2 : Extraction par entraînement à la vapeur (Crouzet, 1996 et Peyron, 1992).

1.2.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage communément appelé cohobage.

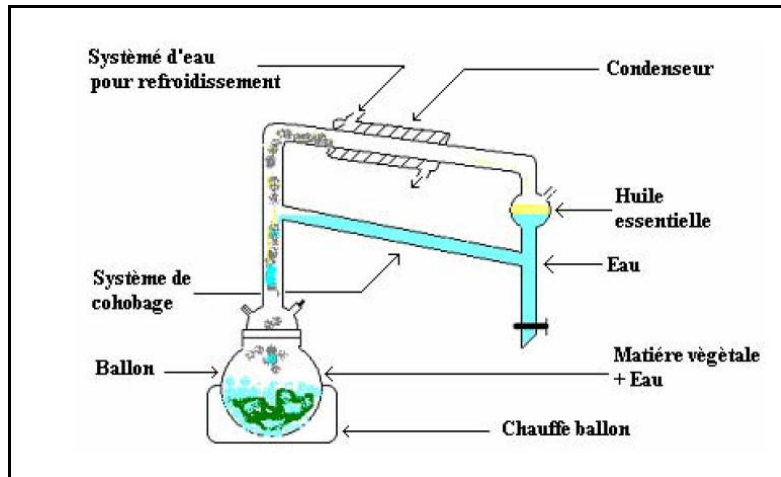


Figure n° 3 : Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle (Bourrel, 1993).

Le montage de type SCHILCHER (Bourrel, 1993) (Cf. figure n° 3) est composé de quatre parties principales :

- le réacteur, un ballon dans lequel on introduit la matière végétale et l'eau ;
- la colonne, un cylindre en verre placé au-dessus du réacteur qui recueille la phase vapeur ;
- le réfrigérant dans lequel se recondensent les vapeurs ;
- le vase florentin où vont se séparer la phase organique (huile essentielle) et la phase aqueuse (eau florale).

Ce système peut être équipé d'un recyclage ou cohobage : un principe de siphon renvoie l'eau florale du vase florentin vers le réacteur. Un simple robinet au bas du vase permet de recueillir l'huile essentielle à la fin de la réaction. Le milieu réactionnel constitué par la matière végétale et l'eau est porté à ébullition grâce à un chauffe-ballon. La température est limitée par la température d'ébullition de l'eau 100 °C. La composition chimique des

huiles essentielles dépend largement de l'influence des conditions d'hydrodistillation sur l'essence contenue dans la plante.

1.2.3. Expression à froid

L'expression à froid (Cf. figure n° 4) est une extraction sans chauffage réservée aux agrumes. Le principe de ce procédé mécanique est fondé sur la rupture des péricarpes riches en huiles essentielles. L'huile essentielle ainsi libérée est entraînée par un courant d'eau. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation (Dugo *et al.*, 2002 ; Kimball, 1999).

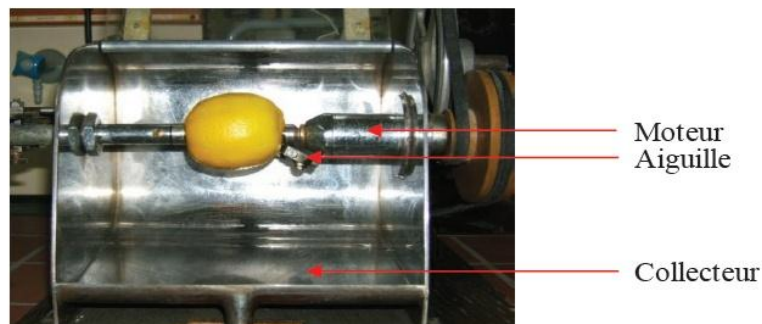


Figure n° 4 : Schéma du montage de l'expression à froid (Ferhat, 2007).

L'utilisation de grandes quantités d'eau dans cette technique peut altérer les qualités des huiles essentielles, par hydrolyse, par dissolution des composés oxygénés et par transport de micro-organismes. C'est pour cette raison que les constructeurs cherchent à s'affranchir de l'utilisation de l'eau lors d'une telle extraction. Ainsi, pour éviter ces altérations, de nouveaux procédés physiques usuels sont apparus. Ils sont basés sur l'ouverture des sacs oléifères par éclatement sous l'effet d'une dépression, ou l'utilisation du principe de l'abrasion de l'écorce fraîche (Ferhat, 2007).

1.2.4. Extraction au CO₂ supercritique

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid aux matières premières végétales utilisant le gaz carbonique ou CO₂, sous pression et à température supérieure à 31 °C. Le gaz carbonique se trouve dans un état dit «supercritique » intermédiaire entre le gaz et le liquide. Dans cet état, le CO₂ présente la particularité de dissoudre de nombreux composants

organiques. Cette propriété á être mise à profit pour extraire la matière première végétale intéressante pour la parfumerie. Pour cette application, l'extraction au CO₂ supercritique présente de nombreux avantages par rapport aux procédés d'extraction traditionnelle. Les matières premières ainsi obtenues sont proches des produits naturels d'origine et sans solvant résiduel (Beneteaud, 2011).

Les méthodes varient selon la nature de la partie de la plante distillée (fleur, racine, écorce, feuille ou baie) et selon les progrès des techniques de l'industrie du parfum, pendant de nombreuses années, les trois seules méthodes utilisées furent la distillation pour les plantes entières, l'enfleurage pour les fleurs fragiles, comme le jasmin, la violette, la rose de mai ou mimosa, et l'expression mécanique pour obtenir les essences d'agrumes pour usage aromatique, seules les huiles essentielles obtenues par distillation à la vapeur lente et expression mécanique satisfont aux normes strictes (Danielle et Olide, 2007).

1.3. Composition chimique des huiles essentielles

Leur composition chimique est déterminée par chromatographie gazeuse (GC) et spectrométrie de masse (SM). Elles sont composées de trois types (groupes) de composantes : les terpènes, les composés aromatiques et les composés d'origines diverses (Homsy, 2009).

1.3.1. Les terpènes de formule $(C_5H_8)_n$

Pour les huiles essentielles, il s'agit des terpènes les plus volatiles : monoterpènes et terpènes sesquiterpéniques, porteurs de fonctions dont le degré d'oxydation est variable. Les substances possibles sont nombreuses (Homsy, 2009).

a. Monoterpènes $C_{10}H_{16}$ ($n=2$)

Ils peuvent être acyclique, monocyclique (thymol), ou bicyclique. Ils sont les principaux constituants des huiles essentielles, qu'ils présentent avec un pourcentage de 90%, sont considérés comme premier maillon dans la biosynthèse et présents dans de nombreux végétaux (Homsy, 2009).

b. Sesquiterpènes (n=3)

Ils sont l'objet de nombreux cyclisation, de réarrangement, d'oxydation conduisant à un très grand nombre de sature. Celles-ci peuvent se présenter sous forme de l'actone facilement allergisantes (Homsy, 2009).

1.3.2. Les composés aromatique biosynthétises

Ces composés ne se trouvent que dans certaines huiles essentielles et présentent généralement des odeurs très marquées : anéthol de l'anis ou de la badiane, aldéhyde cinnamique de l'écorce du cannellier, eugénol du bouton floral (clou du giroflier) (Jean-Marc, 2011).

1.3.3. Les composés divers

Lors de la distillation, certaines composés aliphatiques (carbures, acides, alcools, aldéhydes, esters) sont entraîné (Laurence, 2009). On peut citer dans ce groupe les composés soufrés des moutardes, l'antranilate de méthyle du bigaradier (Jean-Marc, 2011).

1.4. Paramètres influençant la composition des huiles essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories :

1.4.1. Facteurs intrinsèques

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal (Bruneton, 1999).

L'influence du stade végétatif (Stefanini *et al.*, 2006; Aprotosoia *et al.*, 2010), l'organe de la plante (Chowdhury *et al.*, 2009), les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploïdie (Garnéro, 1991; Aprotosoia *et al.*, 2010) et le polymorphisme chimique « chimiotypes ou formes physiologiques » (Garnéro, 1991; Belyagoubi, 2006) sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles.

1.4.2. Facteurs extrinsèques

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles. La température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (Bruneton, 1999; Mohammad *et al.*, 2009; Olle et Bender, 2010; Aprotosoiaie *et al.*, 2010). Il n'y a pas eu mal des travaux ayant mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (Barry, 2001; Mohammedi, 2006; Marzoukia *et al.*, 2009), les conditions culturelles telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (Barry, 2001; Lahlou, 2004; Stefanini *et al.*, 2006; Benini, 2007; Aprotosoiaie *et al.*, 2010).

L'instabilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations, etc. (Silou, 2003; Lucchesi, 2005).

La méthode d'extraction (Huang *et al.*, 1987; Weinreich et Nitz, 1996; Bruneton, 1999; Mohamed, 2005; Abramson *et al.*, 2007; Benini, 2007; Silano et Delbò, 2008) et l'état du matériel végétal (Pinto *et al.*, 2006; Hettiarachichi, 2008) influent aussi sur la composition et le rendement des huiles essentielles. Il faut aussi signaler que le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles (Besombes, 2008).

1.5. Toxicité des huiles essentielles

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées (Pibiri, 2006).

Cependant quelques informations sur certaines toxicités sont décrites par la littérature : En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL50 supérieures à 5g/kg. En ce qui concerne la lavande la toxicité est faible autour des 5g/kg (donnée observée chez l'animal) (Bruneton, 1993). Chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, les plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles essentielles.

Certains auteurs (Franchomme *et al.*, 1990 ; Mailhebiau, 1994) se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent.

Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxique selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la lavande (Inouye, 2003).

1.6. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (Valnet, 2005).

1.6.1. Activité antibactérienne

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HEs, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson *et al.*, 2002). De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HEs sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (Davidson, 1997).

Le mode d'action des HEs dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (Cox *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2002). Une

inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Les HEs peuvent aussi inhiber la synthèse de ADN, ARN, des protéines et des polysaccharides (Cox *et al.*, 1991).

1.6.2. Activité antiviral

De nombreuses familles de molécules ont montré *in vitro* une activité antivirale et parmi elle : les monoterpènes et les monoterpènes. Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques et de nombreuses pathologies virales sévères montrent de l'amélioration importante avec leurs utilisations. ((Robert, 2004. Giordin et Kaloustin, 2006).

1.6.3. Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (Lis-Balchin, 2002).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des *Labiaceae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... Etant donnée la grande complexité de la composition chimotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (Voukou *et al.*, 1988). Ils concluent que les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6-diméthoxyphénol) sont plus antifongiques et que les aldéhydes testés (cinnamique et hydrocinnamique). Ils présentent également des propriétés fongistatiques très marquées. Les groupements méthoxy, à l'inverse, ne semblent pas apporter à ce type de molécules une fongitoxicité significative.

Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique: Phénols>Alcools>Aldéhydes>Cétones>Ethers>Hydrocarbures.

Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol > thymol > isoeugénol > eugénol) (Ullree et *al.*, 2002).

L'addition de groupements alkyls au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques paraît donc requis pour exprimer une caractéristique antifongique optimale. L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. Les travaux de Chao et *al.* (2000), ont montré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait.

1.7. Les plantes aromatiques sélectionnées pour cette étude

Les plantes sont classées selon l'ordre alphabétique des noms scientifiques.

1.7.1. *Laurus nobilis* L.

Laurus nobilis L., membre de la famille des lauracées qui renferme 32 genres et environ 2000-2500 espèces (Cf. tableau n° 1) (Barla et *al.*, 2007). Actuellement, la plante est largement cultivée dans beaucoup de pays comme plante ornementale et pour la production commerciale tels que la Turquie, l'Algérie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux (Demir et *al.*, 2004; Barla et *al.*, 2007).

Laurus nobilis, Arbuste ou arbre aromatique de 2 à 10 m de haut à tige droite grise dans sa partie basse et verte en haut. Ses feuilles sont alternés, coriaces, légèrement ondulées sur les bords, longues de 16 cm sur 8 cm de large, persistantes vert foncé et glacés sur leur face supérieure et plus pale en dessous. Les fleurs sont dioïques (petites fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés), jaunes, groupées par 4 à 5 en petites ombelles. Le fruit est une petite baie ovoïde de 2 cm de longueur sur 1cm de largeur, noir vernissé à maturité (Iserin, 2001 ; Demir et *al.*, 2004 ; Beloued 2005) .

Tableau n° 1 : Classification botanique de *Laurus nobilis* L.

Règne : Plantes	Sous classe : Dialypétales
Sous règne : Plantes vasculaires	Ordre : Laurales
Embranchement : spermaphytes	Familles : Lauracée
Sous embranchement : Angiospemes	Genre : <i>Laurus</i>
Classe : Dicotylidones	Espèce : <i>Laurus nobilis</i> L.

Source : Quezel et santa, 1962.

De nombreuses études ont été réalisées pour la détermination de la composition chimique des feuilles de *Laurus nobilis* et plusieurs ont prouvé la richesse de ses feuilles en substances actives. Par hydrodistillation les feuilles fournissent environ 10-30 ml/Kg (1-3%) d'huile essentielle (Bruneton 1999, Demir et al., 2004) dont les constituants majoritaires inclut : cinéol, α et β pinène, sabinène, linalol, eugénol, terpinéol, plus d'autres esters et terpenoides, mais dont les proportions varient selon l'origine géographique (Iserin 2001 ; Sayyah et al.,2002 ; Demir et al., 2004).

1.7.2. *Mentha spicata* L.

Les menthes (lamiacées), ces plantes qui portent le nom nymphe grec que métamorphosées en végétale, sont des lamiacées typiquement (Cf. tableau n° 2) (Bernard, 2001). Le nom *Mentha* dérivé de «Mintha», nom grec d'une nymphe, feuille de Cocyte que Proserpine, jalouse, transformé en fleur (Bernard et Bénézra, 2002).

Quelque 30 espèces connus sont tous originaire des zones tempérées « Europe, Afrique du nord, Asie occidentale et Amériques du nord », elles comprennent plus 200 sous espèces, variétés, formes, races et hybride (Bernard et Bénézra, 2002). L'identification de ces espèces est difficile, la plus part susceptible de s'hybrider spontanément avec chacune des autres. Ce sont des plantes herbacées et vivaces qui se caractérisent par des tiges quadrangulaires, des feuilles simples opposés et de petites fleurs pourpres, roses ou blanche. Ces fleurs sont réunis en inflorescences pouvant prendre trois aspects : soit en épi terminale contenu formé de glomérules deux très rapprochées les uns des autres (*Mentha spicata* L.), soit en un seul glomérule terminal soit encore verticille à l'assaille des feuilles (Bernard et Bénézra, 2002).

Tableau n°2 : Classification de *Mentha spicata*.

Règne : Plantes	Sous classe : Dialypétales
Sous règne : Plantes vasculaires	Ordre : Labiales
Embranchement : Spermaphytes	Famille : Lamiacées
Sous embranchement: Angiospermes	Genre : <i>Mentha</i>
Classe : Dicotylidones	Espèce : <i>Mentha spicata</i>

Source : Ernest, 2001.

Pendant les dernières années, les chercheurs ont identifié l'usine en bon état de plusieurs composés biologiquement actifs, le carvone identifiée et le menthol du *Mentha spicata*. Ces deux produits chimiques sont le constituant principal de la menthe. Le constituant en chef d'huile essentielle est le carvone (55-75%) et le limonène (jusqu'à 21.4%) (Khare, 2007). Le rendement d'huile volatile des feuilles et des dessus débordants est environ 0.5% que l'huile contient le limonène de l-carvone de 55% (le cumin et l'aneth contiennent le d-carvone), phellandrene et un certain ester (Daniel, 2006).

1.7.3. *Thymus vulgaris* L.

Le genre *Thymus* est un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées, avec pour centre de diversité la partie occidentale du bassin méditerranéen (Cf. tableau n° 3) (Morales, 2002). L'espèce la plus connue est sans conteste *Thymus vulgaris* L. localement connu *zaatar*. En français et anglais par exemple, on emploie fréquemment le nom du genre (thym et thyme respectivement) pour désigner l'espèce *Thymus vulgaris* (Amiot, 2005). Cette plante se présente toujours dans un état sauvage en plaines et collines, comme la lavande, le romarin, la sauge et beaucoup d'autres plantes sauvages (Kaloustian et al., 2003).

Tableau n°3 : Classification botanique de *Thymus vulgaris*.

Règne : Plantes	Sous classe : Dialypétales
Sous règne : Plantes vasculaires	Ordre : Labiales
Embranchement : Spermaphytes	Famille : Lamiacées
Sous embranchement : Angiospermes	Genre : <i>Thymus</i>
Classe : Dicotylédones	Espèce : <i>Thymus vulgaris</i>

Source : Morales, 2002.

Thymus vulgaris L. est un arbuste aromatique à tiges ramifiées, pouvant atteindre 40 cm de hauteur. Il possède de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose (Bruneton, 1999 et Morales, 2002).

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thymus vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré (Bruneton, 1999) ; l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été analysée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à une spectrométrie de masse (SM), 30 composés ont été identifiés et caractérisés, les plus abondants sont respectivement : thymol (44,4 - 58,1 %), *p*-cymène (9,1 - 18,5 %), γ -terpinène (6,9 - 18,0 %), carvacrol (2,4 - 4,2 %), linalol (4,0 - 6,2 %). La caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée du thymol (Guillén et Manzanos, 1998 ; Balladin et Headley, 1999 ; Hudaib et al., 2002 ; Bouhdid et al., 2006) .

**PARTIE
EXPERIMENTALE**

2. Les champignons phytopathogène

Les champignons sont des contaminants fréquents de nombreux substrats végétaux et de certains produits d'origine animale. Leur présence peut améliorer la qualité organoléptique de produit où, au contraire, l'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines.

Sur 11000 espèces fongiques, environ une certaine est potentiellement toxigènes et une cinquantaine peuvent se rencontrer sur les aliments peu hydratés (Cahagnier, 1998. Du champ au silo les espèces présentes dans les grains évoluent et l'on distingue une flore du champ, puis une flore intermédiaire à laquelle se substitue une flore de stockage. Certaines ne présentent pas desrisques sanitaires, les espèces à risque mycotoxinogènes sont principalement les *Fusaria* au champ ainsi que les *Aspergilli* et les *Penicillia* au cours du stockage (AFSSA, 2006).

Le genre *Aspergillus* appartient au phylum *Ascomycota*, la classe des *Eurotiomycètes*, l'ordre des *Eurotiales* à la famille des trichocomaceae. Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Botton et al., 1990). De nombreusesespèces appartenant au genre aspergillus s ont connus pour leur capacité à produire certaines mycotoxines parmi lesquels *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *A. nomius* sont les principaux producteurs d'afltoxines.

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les produits agricoles. De nombreuses espèces d'aspergillus sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Jarvis et al., 2005). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux.

2.1. Principaux genres phytopathogènes

Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Fusarium* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale.

2.1.1. Le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Cf. figure n° 5) (Raper et Fennell, 1965). Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002); ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994).

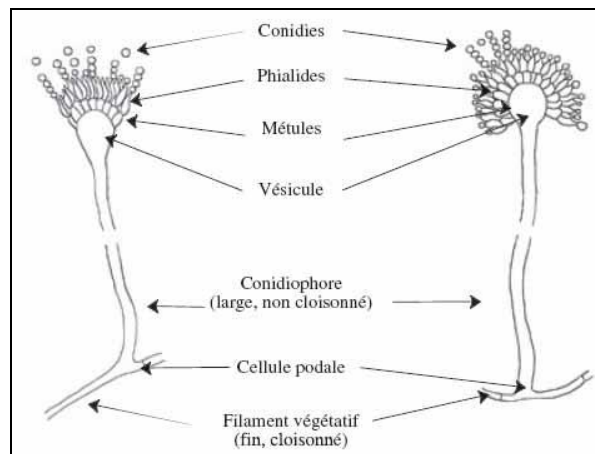


Figure n° 5 : Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (Morin, 1994).

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs ; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C ; les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C (Badillet et *al.*, 1987; Morin, 1994).

Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces : gris-vert pour *A.*

fumigatus, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger* et blanche pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chermette et Bussieras, 1993).

De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont connues pour leur capacité à produire certaines mycotoxines (Pitt, 2000). *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* sont les principaux producteurs d'aflatoxines. L'aflatoxine B1 est classée comme cancérigène chez l'homme et l'animal (IARC, 1993). *Aspergillus fumigatus* synthétise plusieurs métabolites très toxiques comme la fumagiline, l'acide helvolique, la gliotoxine, les dérivés quinoniques, des alcaloïdes voisins de ceux de l'ergot de seigle. *Aspergillus niger* peut produire de l'acide oxalique, des malformines et, certaines souches, des aflatoxines. *Aspergillus ochraceus* est le principal producteur d'ochratoxine A. Il colonise lui aussi de très nombreux substrats. *Aspergillus terreus* élabore des substances antibactériennes, de toxicité variable (flavipine, terréine, citrinine, erdine et molécules voisines, clavacine) (Botton *et al.*, 1990).

2.1.2. Le genre *Penicillium*

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des *Ascomycètes*. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales. Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées.

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud). Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27 °C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3-4 jours

d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge. Cette couleur permet une première orientation dans l'identification d'espèces (Cf. figure n° 6).

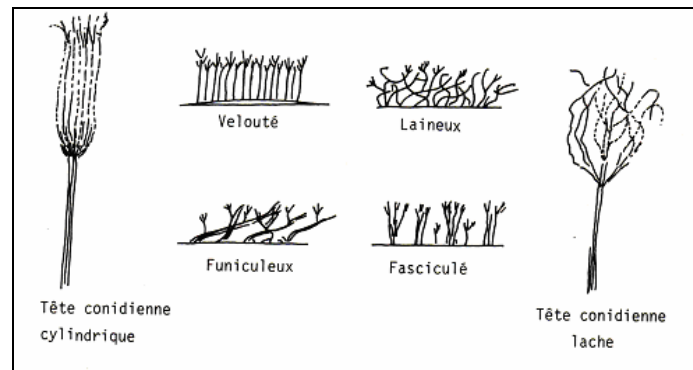


Figure n° 6 : Caractères du thalle de genre *Penicillium* (Botton *et al.*, 1990).

La majorité d'espèces du genre *Penicillium* sont capables de produire des mycotoxines: l'acide cyclopiazonique (*Penicillium chrysogenum*), l'acide pénicillique (*Penicillium cyclopium*) ; la patuline ou la clavacine (*Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum*), la citrinine (*Penicillium expansum*), l'ochratoxine A (*Penicillium verrucosum*) (Pitt, 2000).

2.1.3. Le genre *Fusarium*

Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des *Deutéromycètes*. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des *Ascomycètes* (ordre des *Hyphocreales*, famille des *Nectriaceae*, genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*). Sur le plan économique le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes. De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), des légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers.

Les *Fusarium* poussent sur milieu Sabouraud, mais se développent mieux sur gélose au malt ou sur milieu PDA (potato-dextrose-agar). Leur température optimale de croissance est comprise entre 22 et 37 °C. Sur les milieux de culture, les *Fusarium* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas) selon les espèces. Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet. Les pigments diffusent souvent dans la gélose (Chermette et Bussieras, 1993). Le genre *Fusarium* comprend des espèces capables de produire de nombreuses mycotoxines : les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines.

- *Fusarium poae*, *F. sporotrichioides*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum* produisent des trichothécènes de types A et B ;
- *Fusarium verticillioides* (*moniliforme*) et *F. proliferatum* synthétisent les fumonisines ;
- *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* et *F. sporotrichioides* produisent de la zéaralénone (Pitt, 2000).

2.2. Facteurs de développement des champignons

Les facteurs qui contribuent au premier lieu à la biodétérioration (dont fait partie le développement de moisissures) d'un écosystème sont l'humidité, la température et les ravageurs (FAO, 2003). Le développement de moisissures dépend de plusieurs facteurs : l'humidité, la température et la présence de spores et d'éléments nutritives. La température et l'humidité conditionnent leurs proliférations, il est généralement admis que, à température ambiante, les moisissures ne peuvent proliférer que si l'humidité relative locale dépasse 80% pendant plusieurs semaines. L'humidité relative locale dépend de l'humidité absolue de l'air intérieur et de la température locale (Claude, 2004). Les moisissures se développent le mieux dans une atmosphère chaude et humide. Elles se développent même à basse température si l'humidité relative de l'air est élevée, c'est-à-dire si l'air contient beaucoup de vapeur d'eau. Une atmosphère sèche prévient la germination des spores et par conséquent le développement de moisissures. Cependant, elle ne tue pas les spores qui sont très résistantes aux conditions sèches (Inge, 2004).

La prolifération des moisissures dépend de la teneur en eau des grains, de leurs températures et de l'importance des dommages physiques qu'ils causent. Dans certaines circonstances, le développement de mycotoxines peut constituer un danger particulier (FAO,

1995). L'humidité et la température favorisent le développement des moisissures secrétant des mycotoxines qui constituent actuellement un problème de santé public (Abdoulaye, 2012). Dans les céréales, les moisissures utilisent la vapeur d'eau présente dans les interstices entre les grains dont la concentration est déterminée par l'équilibre entre l'eau libre contenue dans le grain (la teneur en eau du grain) et l'eau présente sous forme de vapeur autour du grain. La concentration de l'eau interstitielle est désignée soit par les termes d'humidité relative d'équilibre (exprimée en pourcentage), soit par ceux de facteur d'humidité (FAO, 2003).

Les moisissures se disséminent également par l'intermédiaire de leurs spores transportées par l'air ou véhiculées par les insectes. Les mycotoxines se concentrent volontiers dans ces spores, contaminants l'air respirable, adsorbées sur des particules organiques ou par la poussière (Pierre, 2000 ; Zaid et Pierre, 2011). Enfin, les moisissures peuvent servir de nourriture pour les insectes et les mites, mais, dans certains cas, être pour eux des agents pathogènes (FAO, 2003). L'autre facteur susceptible d'influer sensiblement sur le développement des moisissures est la proportion de grains brisés se trouvant dans un lot de céréales. Ces grains, endommagés par la moisissure ou les insectes (FAO, 2003), et les différents impuretés (poussières, farines, pailles) et les grains briser sont plus facilement attaques par les moisissures et les insectes et constitue pour les stocks des foyers d'infestation privilégiés (Aliou et Cruz, 1989).

2.3. Les problèmes phytosanitaires liés à ces agents phytopathogènes

2.3.1. Les maladies

La pourriture racinaire, la pourriture de pied et la pourriture commune, sont des noms qui se rapportent à une même maladie d'origine fongique (*Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Cochlibolus sativus*) et qui peut affecter le blé et l'orge. La pourriture racinaire est répandue dans toutes les régions du Maghreb. Des réductions en rendement de grain, en poids de grains, en émergence des plantules, en nombre de talles et d'épis, sont souvent rapportées (Sayoud et al., 2008).

La maladie striée causé par (*Helminthosporium gramineum*, *Pyrenophora graminea*) étant une maladie transmise uniquement par la semence, elle est là, où la désinfection de la semence ne se fait pas. Elle est d'incidence négligeable au Maroc et en Tunisie, alors qu'en Algérie est considérée comme la maladie des céréales la plus répandue avec une incidence

atteignant les 80%. C'est une maladie très destructive du fait que les plantes infestées ne produisent quasiment aucune graine (Sayoud et *al.*, 2008).

Les grains de céréale forment également un excellent milieu de culture pour les moisissures. Pendant le stockage, les céréales subissent généralement une perte de qualité, assurée par une infection des mycètes, des insectes et des acariens. Cette détérioration est caractérisée par une diminution de la germination, une décoloration, des changements chimiques et nutritionnels, un durcissement et de mauvais goûts qui ont comme conséquence le rejet du produit (Mills, 1990). L'activité fongique mène également aux pertes de matière sèche et de la valeur nutritive ainsi qu' à des problèmes de santé dus à la formation des mycotoxines et des spores allergéniques (Olsson, 2000).

2.3.2. Mycotoxines

Les mycotoxines sont des substances élaborées par des champignons dont la toxicité ne s'exerce sur la plante hôte, mais sur les consommateurs (Royer, 1990). En générale, les mycotoxines transférées dans la chaîne alimentaire sont en quantité très faibles, de l'ordre du nanogramme par kilogramme (ng/kg) (Zaid et Pierre, 2011). On distingue deux types d'accidents : les accidents aigus font suites à l'ingestion d'une grande quantité de mycotoxines et une maladie chronique qui fait généralement suit à l'ingestion de mycotoxine en faible quantité mais sur une long période, cette chronique provoque un affaiblissement du système immunitaire (Gury, 1997), à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire et l'appareil respiratoire, ainsi que sur l'appareil digestif. Elles peuvent aussi avoir des effets cancéroènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs (FAO, 2003).

Les mycotoxines peuvent être produites par cinq genres de champignons : les *Aspergillus*, les *Penicillium*, les *Fusarium*, les *Claviceps*, les *Altenria*. Plus de trois cents mycotoxines, dont la structure chimique est identifiée, ont été produites artificiellement à partir des 350 types de moisissures (Moll et Moll, 1995). Le Tableau ci-dessous (Cf. tableau n° 4) représente les principales mycotoxines dans le monde.

Tableau n° 4 : Les principaux mycotoxines dans le monde

Espèce de moisissure	Mycotoxines engendrées	Les denrées
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxines B1, B2, G1, G2	Oléagineux, pastiches, épices, maïs, sorgho, grains de coton,
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines B1, B2	Oléagineux, pastiches, épices, maïs, sorgho, grains de coton,
<i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>F.poaie, F.tricinctus</i>	Trichothécenes (Toxine T-2, DON...)	Blé, Orge, maïs, riz, seigle, avoine
<i>Fusarium graminearum</i>	Déoxynivalénol (ou nivalénol), Zéaralénone Trichothécenes (Toxine T-2, DON...)	Blé, Orge, maïs, riz, seigle, avoine
<i>Fusarium moniliforme</i> (<i>F. verticillioides</i>)	Fumonisine B1	Blé, Orge, maïs, riz, seigle, avoine
<i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium crookwellense</i>	Zéaralénone Trichothécenes(Toxine T-2,DON...)	Blé, Orge, maïs, riz, seigle, avoine
<i>Aspergillus niger</i>	Ochratoxine A Fumonisine B2	Oléagineux, pastiches, épices, maïs, sorgho, grains de coton,
<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Ochratoxine A	Oléagineux, pastiches, épices, sorgho, céréales, café
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'ergot	Blé et dérivés, seigle
<i>Pithomyces bakeri</i> (<i>Sporidesmium</i>)	<i>Sporidesmine</i>	Divers graminées
<i>Acremonium sp.</i>	Une neurotoxine	
<i>Penicillium islandicum</i>	Lutéoskryrine	Riz et autres céréales
<i>Alternaria</i>	Alternariol, acide tenuazonique	Fruit (pomme et tomate) et légumes.
<i>P.expansum, A.clavatus,</i>	Patuline	

Source : Guy, 2007 ; Christine, 2010 ; Royer,1990 ; FAO,2003 ; Keon et proost, 2002

La présence de moisissures sur les graines ne signifie pas nécessairement la formation de mycotoxines (Pfohl-Leskowicz, 1999). Il existe des souches produisant des mycotoxines et des souches qui n'en produisent pas ou peu. La plus dangereuse de ces mycotoxines est l'aflatoxine B1 (AFB1) à cause de ces dégâts pathologiques sévères, elle est produite par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Godon et Loisel, 1997).

2.4. Lutte contre les champignons phytopathogènes

La protection des plantes peut être divisée suivant cinq approches (Cf. figure n° 7). Une proportion largement majoritaire des denrées agricoles est produite à l'intérieur de

systèmes où la protection des plantes repose sur la lutte chimique. Les facteurs humains interviennent pour limiter le recours aux produits chimiques ou pour l'encourager. Par exemple, en raison de normes de commercialisation aux exigences drastiques, en particulier celles liées à l'apparence des produits agricoles, sans égard équivalent pour les qualités diététiques objectives de ces produits, les agriculteurs doivent recourir à des moyens performants de lutte contre les organismes nuisibles ce qui, dans le contexte actuel, encourage le recours aux pesticides chimiques.

La lutte biologique et les biopesticides constituent des outils facilitant l'implantation de programmes de lutte offrant un équilibre plus acceptable entre le besoin impératif de protéger les cultures et le respect des exigences écotoxicologiques. Dans la même optique, la protection des végétaux faisant appel à des techniques de lutte physique, autant au niveau de la production que de la conservation, présente un intérêt accru. En effet, la plupart des techniques de lutte physique n'ont pas d'impact sur l'environnement. Lorsqu'il y a un impact, il est généralement circonscrit à un espace restreint et au moment de l'application du traitement. De plus, les techniques de lutte physique ne font intervenir aucune substance chimique ou biologique et ne peuvent donc pas laisser de résidus indésirables sur les denrées destinées à la consommation humaine ou animale (Vincent et *al.*, 2000).

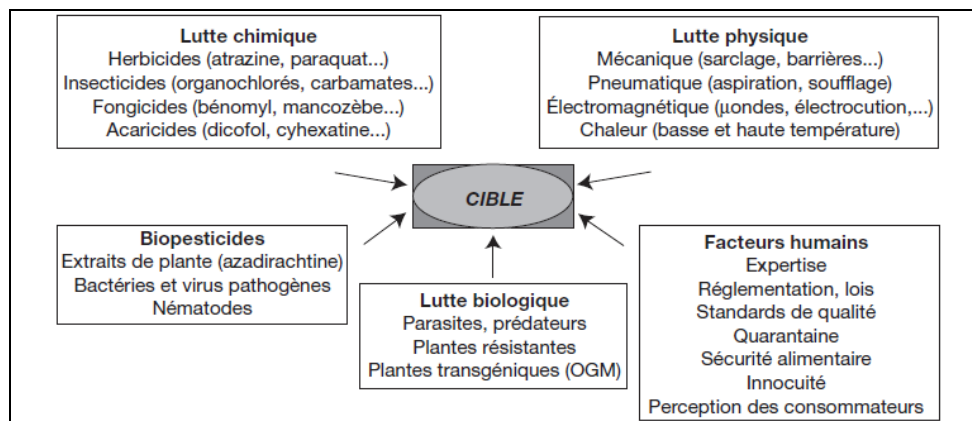


Figure n° 7: Les cinq approches de la protection des cultures (Vincent et *al.*, 2000).

2.4.1. Lutte physique

La lutte physique en protection des plantes regroupe toutes les techniques de lutte dont le mode d'action primaire ne fait intervenir aucun processus biologique ou biochimique. L'utilisation de méthodes de lutte physique doit s'inscrire dans une démarche de lutte intégrée. En effet, comme toute méthode de lutte, les méthodes physiques ont leurs forces et

leurs faiblesses et certaines sont susceptibles d'avoir des effets secondaires sur la faune et la flore. De plus, il n'existe pas de technique de lutte physique ayant le potentiel de devenir la seule technique nécessaire (ou suffisante) pour tous les traitements phytosanitaires sur une culture donnée. Il convient de distinguer deux types fondamentaux de méthodes en lutte physique : les méthodes actives et les méthodes passives. Les méthodes actives utilisent de l'énergie au moment de l'application pour détruire, blesser ou stresser les ennemis des cultures, ou pour les enlever du milieu. Ces méthodes n'agissent qu'au moment de l'application et ne présentent pratiquement pas de rémanence. Les méthodes passives procèdent par une modification du milieu et ont un caractère plus durable. On peut aussi classer les méthodes physiques selon le mode d'utilisation de l'énergie (Vincent *et al.*, 2000).

En phytopathologie, on retrouve moins de travaux scientifiques concernant la lutte physique. Par exemple, l'utilisation des films de polyéthylène ayant des propriétés filtrantes à l'égard de parties spécifiques du spectre de lumière solaire. C'est donc une technique passive faisant appel à une barrière physique. Le traitement des semences de blé à l'aide de micro-ondes pour le contrôle de *Fusarium graminearum* a été évalué (Reddy *et al.*, 1996). Des essais similaires ont été réalisés par ces auteurs pour l'inactivation d'*Ustilago nuda* sur des graines d'orge. Dans la culture de la pomme de terre, on utilise souvent un fongicide en complément du défoliant chimique comme mesure sanitaire prévenant la transmission de l'infection par *Phytophthora infestans* à la prochaine production. Le défanage thermique, qui remplace la défoliation chimique, réduit significativement la viabilité de *P. infestans* présent dans les feuilles au moment du défanage (Désilets *et al.*, 1996). Les usages de la lutte physique en post-récolte se sont développés à travers les procédés de contrôle des conditions physiques dans les masses de grain stockées (température et teneur en eau), les chocs thermiques ou mécaniques. De plus, les méthodes physiques les plus accessibles pour cette lutte raisonnée, comme les traitements par la chaleur sèche ou la conservation hermétique sous gaz inerte, devraient être bénéfiques sur le plan de la réduction du risque secondaire de détérioration des denrées brutes par les moisissures de stockage, ce qui n'est pas le cas de la lutte chimique (Vincent *et al.*, 2000).

2.4.2. Lutte chimique

Les traitements chimiques sont largement utilisés pour combattre les maladies fongiques et bactériennes. Le chiffre d'affaire mondial des produits phytosanitaires avoisine

les 23 milliards d'euros avec une part pour les fongicides de 18 % et de moins d'1% pour les produits antibactériens. Les quelques 120 matières actives antiparasitaires disponibles sont principalement des molécules organiques de synthèse, avec toutefois quelques substances minérales dont le soufre élémentaire et les produits cupriques, ainsi que les antibiotiques. La plupart des molécules antibactériennes et/ou antifongiques utilisables en agriculture agissent directement sur les agents pathogènes. Selon l'action exercée au niveau du cycle parasitaire de base, un fongicide possède une activité préventive ou antipénétrante, curative ou antisporeuse. En fonction de son comportement, le fongicide peut être de surface (ou de contact), pénétrant, translaminaire ou systémique (PIP/COLEACP, 2011).

2.4.3. Lutte biologique

La lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes est définie comme l'utilisation de processus biologiques pour diminuer la densité d'inoculum des agents pathogènes dans le but de réduire leur capacité à induire la maladie. Les principaux critères de sélection d'un agent de lutte biologique contre des agents pathogènes des plantes sont : la stabilité génétique de la souche, son efficacité à faible concentration et le grand nombre d'agents pathogènes, ses faibles exigences nutritionnelles, sa capacité d'adaptation et de suivre aux conditions environnementales, la possibilité de production de masse à faible coût, son absence de toxicité sur d'autres organismes, sa résistance aux pesticides et sa compatibilité avec d'autres traitements (Cf. tableau n° 5) (Lydide, 2010).

Tableau n° 5 : Exemples de biopesticides développés pour le contrôle des ennemis et compétiteurs des plantes cultivées (Vincent *et al.*, 2000).

Bactéries entomopathogènes	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Mycopesticides	<i>Metarhizium anisopliae</i> et <i>M. flavoviride</i> <i>Beauveria bassiana</i> , <i>B. brognardtii</i> , etc.
Virus entomopathogènes	Baculovirus (carpovirusine)
Bioherbicides	<i>Colletotrichum</i> sp (Waage, 1995)
Microorganismes antagonistes de maladies	<i>Trichoderma viridae</i> ; <i>Gliocladium</i> sp ; <i>Pseudomonas</i> sp.
Nématodes entomopathogènes	genres <i>Steinernema</i> et <i>Heterorabditis</i>

En pratique, l'application de la lutte biologique repose souvent sur une multitude d'actions et d'informations complexes et fines. La lutte biologique est séduisante sur le plan

scientifique et écologique et son image plaît au grand public. On distingue plusieurs stratégies d'application en lutte biologique. La première stratégie, l'exploitation de biocides inertes, est l'approche « biopesticide ». La seconde stratégie est l'exploitation de biocides autonomes, que l'on peut relâcher selon une stratégie de lutte classique, inoculative ou inondative. Il est également possible de favoriser la lutte biologique en intervenant sur le milieu. La variation entre les organismes est une caractéristique inhérente et fondamentale des organismes biologiques et constitue une des limites importantes de la lutte biologique (Vincent *et al.*, 2000). Parmi les méthodes de lutte biologique, les biopesticides occupent une place de choix car ils se prêtent souvent à la production de masse requise pour l'industrie et ils s'appliquent avec un pulvérisateur conventionnel ce qui en facilite l'adoption par les producteurs agricoles. Ils sont généralement compatibles avec des méthodes de lutte biologique, même s'ils peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes utiles (Giroux *et al.*, 1994 ; Roger *et al.*, 1995). Les biopesticides peuvent être à base de bactéries, champignons, virus, nématodes et d'extraits de plantes. Il y a plusieurs façons d'améliorer l'efficacité des biopesticides. On peut trouver des souches plus virulentes. On peut aussi travailler à des formulations prolongeant la rémanence au champ ou incorporant des produits synergistes qui, étant eux-mêmes non toxiques aux doses utilisées, augmentent de beaucoup l'effet toxique du biopesticide (Bernard et Philogène, 1993). Certains champignons hyperparasites d'agents pathogènes font également l'objet de recherches intensives : *Ampelomyces quisqualis*, *Tilletiopsis*, *Verticillium lecanii* et *Stephanoascus*, pour ne citer que les plus répandus. Des mutants résistants à la sécheresse sont également recherchés pour favoriser l'action de ces hyperparasites sur les champignons pathogènes. Les réductions de l'usage des fongicides peuvent être de l'ordre de 50 % sachant qu'il est impossible de concevoir la lutte contre les mycopathogènes de la vigne par exemple avec moins de 5 à 8 applications de fongicide dans la phase de végétation de la plante (Vincent *et al.*, 2000).

Récemment, des études fondamentales (*in vitro*) ont également montré que la phase volatile des huiles essentielles (alcools et lactones sesquiterpiniques) provoque un effet fongistatique par inhibition de croissance, ce qui permettrait le contrôle de la prolifération et surtout de dissémination des champignons opportunistes allergisants. On pourrait alors envisager une utilisation préventive d'huile de l'atmosphère des locaux (Daniel *et al.*, 2008).

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel fongique

Les six champignons utilisés dans ce travail sont des espèces fongiques responsables des dégâts considérables qu'ils causent aux cultures des céréales et des fruits et des légumes. Les quatre champignons sont des souches de référence proviennent de la collection BCCM (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms) :

- *Fusarium graminearum* MUCL 53452
- *Fusarium verticillioides (moniliforme)* MUCL 53645
- *Penicillium citrinum* MUCL 31475
- *Penicillium expansum* MUCL 29192

Les autres moisissures sont isolées et partiellement identifiées au niveau du Laboratoire de phytopathologie-Département d'agronomie-Université de Laghouat :

- *Alternaria* sp.
- *Aspergillus niger*

1.2. Matériel végétal

Les huiles essentielles de trois plantes aromatiques *Laurus nobilis*, *Mentha spicata*, *Thymus vulgaris* sont utilisées comme des agents antifongiques, les extraits des huiles essentielles des deux plantes *Laurus nobilis*, *Thymus vulgaris* ont été obtenus l'année précédente

La récolte des parties aériennes (feuilles et tiges) de *mantha spicata* a été réalisée, en Septembre 2013 (Cf. tableau n° 6). Le matériel végétal est séché à la température ambiante et à l'abri de la lumière dans un endroit sec et aérer pendant deux mois. Après le séchage, la plante est récupérée dans des sacs propres pour servir ultérieurement à l'extraction des huiles essentielles.

Tableau n° 6: Origine et période de récolte de matériel végétal

Plante	Origine	Dates de prélèvement	Dates d'extraction
<i>Laurus nobilis</i>	Laghouat	Février 2013	2013
<i>Mentha spicata</i>	El Bayedh	Septembre 2012	2014
<i>Thymus vulgaris</i>	Blida	Septembre 2013	2013

1.2.1. Procédé d'extraction des huiles essentielles

Après le séchage du matériel végétal, l'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydro-distillation dans un appareil de type Clevenger (Cf. figure n° 8). 150 grammes du matériel végétal sont mises dans un ballon à fond rond et additionnés à l'eau distillé (1500 ml), puis sont portés à l'ébullition pendant 4 h (Kalamouni, 2010). L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide. L'huile extraite est conservée à 4°C dans l'obscurité.

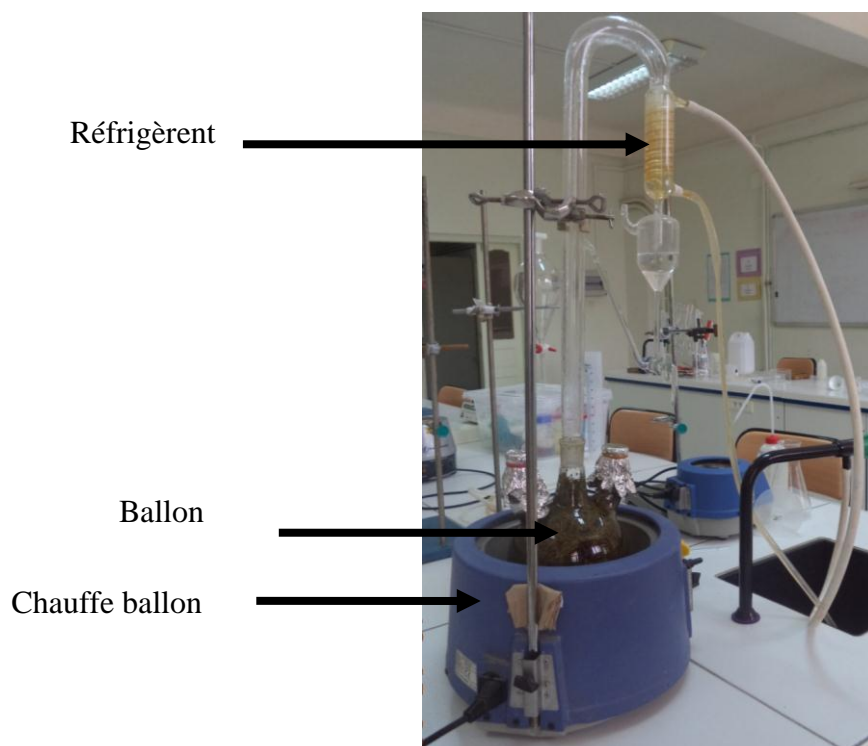


Figure n° 8: Dispositif d'hydrodistillation(Originale)

1.2.2. Calcule du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traité.

$$\text{Rd \%} = (m_1 \times 100) / m_0$$

m_0 : masse en gramme de la matière végétale sèche
 m_1 : masse en gramme d'huile essentielle
Rd : Le rendement en huile essentielle.

1.2.3. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles par la méthode (CG) couplée à la Spectrométrie de masse (SM)

Les échantillons ont été envoyés au Laboratoire de chimie analytique, Faculté des pêches, Université de Cukurova, Turquie, pour la détermination de la composition des huiles essentielles sur la Chromatographie en phase gazeuse (CG) couplée à la Spectrométrie de masse (SM) de type Perkin Elmer Clarus 500 (CG - SM), équipé d'une colonne SGE (60 m. 0.25mm ID. BPX5 0,25um, USA). L'appareil comprend deux injecteurs capillaires améliorées, split/ splitless (PSS) et sur colonne (POC). La température de la colonne est programmée de 60 à 250 °C pendant 10 min à raison d'une montée de 4 °C. La température d'injection est réglée à 240 °C. Le gaz utilisé est l'hélium avec un débit de 1.5 ml/mn. La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. La gamme de masse scannée est de 35-425 m/z. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse Nist et Wiley. L'huile essentielle est diluée dans du n-hexane (1%, v/v) avant de procéder aux analyses CG/SM. Le volume injecté est 1 µl.

1.3. Détermination de la CMI et CMF:

1.3.1. Préparation des dilutions de l'agent antifongique

L'activité antifongique des huiles essentielles de Thym, laurier et menthe a été évaluée selon la méthode de macro-dilution en milieu liquide M38-A préconisée par CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Espinel-Ingroff et Cantón, 2007). Les dilutions de l'agent antifongique insoluble dans l'eau doivent être préparées à l'aide d'un solvant de type DMSO (Sigma 34943).

Il est important de préparer la solution mère et les dilutions de l'huile essentielle dans le solvant DMSO selon le protocole décrit ci-dessous (Cf. figure n° 9):

- a) étiqueter 10 tubes de 2 à 11.
- b) ajouter des quantités appropriées de DMSO dans chaque tube comme suit:
 - ajouter 0.5 ml de DMSO aux tubes (3), (6) et (9) ;
 - ajouter 0.75 ml de DMSO aux tubes (4), (7) et (10) ;
 - ajouter 1.75ml de DMSO aux tubes (5), (8) et (11) ;
- c) étiqueter le tube de la solution stock (2000 µl/ml) entant que le tube (2) ;
- d) transférer à partir du tube (2) 0.5 ml au tube (3) et 0.25ml aux tubes (4) et (5) ;
- e) transférer à partir du tube (5) 0.5 ml au tube (6) et 0.25ml aux tubes (7) et (8) ;
- f) transférer à partir du tube (8) 0.5 ml au tube (9) et 0.25ml aux tubes (10) et (11) ;
- g) enfin, jeter 1ml du tube 11.

Après la préparation des dilutions de l'antifongique, on constate que tous les tubes contiennent 1 ml. Mélanger bien au vortex avant de chaque étape de transfert.

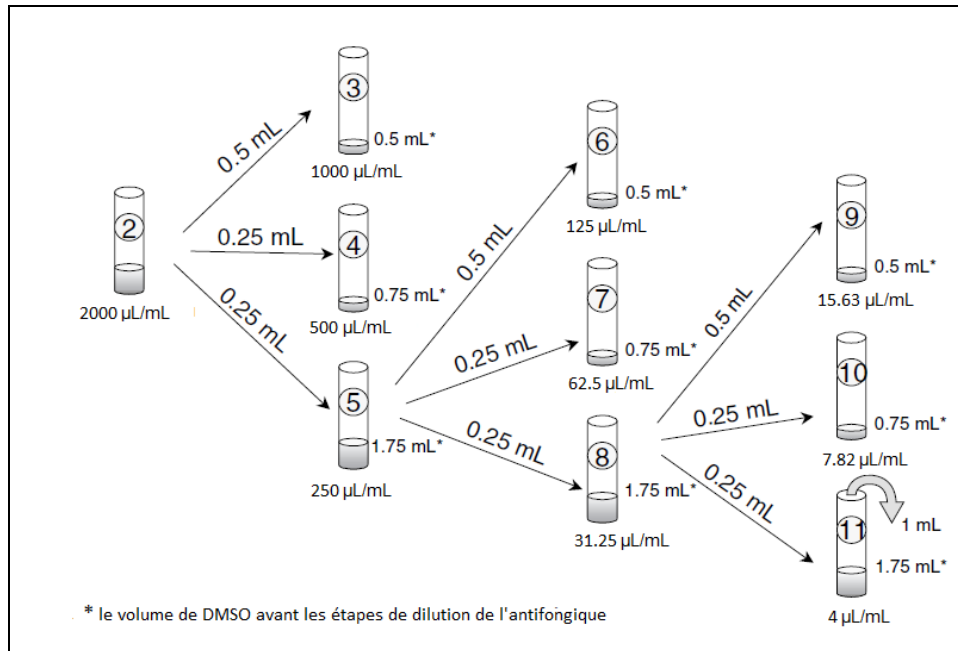
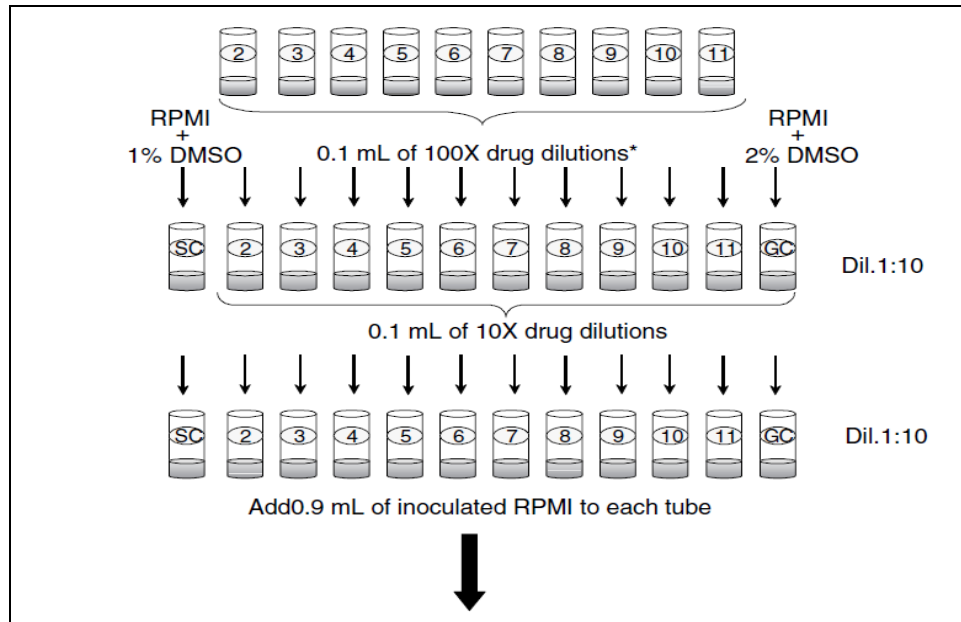


Figure n° 9: Les dilutions de l'agent antifongique insoluble dans l'eau (Espinel-Ingroff et Cantón, 2007)

1.3.2. Préparations des tubes CMI de l'agent antifongique

Placer les tubes contenant les dilutions de l'antifongique (1 ml) d'une manière organisée, de la concentration la plus élevée vers la plus bas, et de les ranger en étiquetant 10 nouveaux tubes avec la concentration de l'antifongique finale de 20 à 0.04 $\mu\text{l/ml}$. RPMI 1640 (avec de la glutamine, sans bicarbonate, et avec un indicateur de pH, Sigma R6504) est le milieu recommandé par la norme M38-A (Espinel-Ingroff et Cantón, 2007) pour les tests de sensibilité des moisissures (cf. l'Annexe n° 3). Le milieu doit être tamponné avec MOPS (Sigma M3183) (0.164 mol/l).

Préparer une dilution 1:10 en ajoutant 0,9 ml de RPMI 1640 au 0.1 ml de chaque dilution de l'antifongique, et mélanger bien au vortex. Notons, que neuf séries de tubes CMI peuvent être préparées avec ces volumes. Enfin, à l'aide d'une pipette, distribué à nouveau 0.1 ml de chaque concentration dans le fond de chaque tube à essai stérile en commençant par la plus faible concentration. En suite, chaque tube est ensemencé avec 0.9 ml de l'inoculum correspondant, et la concentration finale de DMSO est de 1% (Cf. figure n° 10).



Concentrations finales après inoculation 20 à 0.04 $\mu\text{l/ml}$

Figure n° 10: Préparation des tubes CMI de l'agent antifongique insoluble dans l'eau (Espinel-Ingroff et Cantón, 2007)

1.3.3. Préparation des suspensions fongiques

Pour chaque champignon, l'inoculum doit être préparé à partir d'une culture de 7 jours en milieu PDA à 25°C. Récupérer les spores en imbibant un écouvillon stérile avec du Tween 20 et de le transférer dans 3 ml de solution saline stérile 8.5%. Pour empêcher l'agglutination des spores, mélanger vigoureusement à l'aide d'un vortex la suspension de spores pendant 15-20 secondes, puis transférer le surnageant dans un tube stérile et ajuster la densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway, 6405 UV/VIS) à 530 nm pour obtenir une suspension de stock de 0.4-5x10⁶ spores/ml. La DO à laquelle l'inoculum doit être réglé varie en fonction de la taille des spores (cf. Annexe n°2). Enfin, préparer une suspension de travail en diluant la suspension mère 1:100 spores dans le milieu d'essai RPMI 1640 (Cf. figure n° 11).

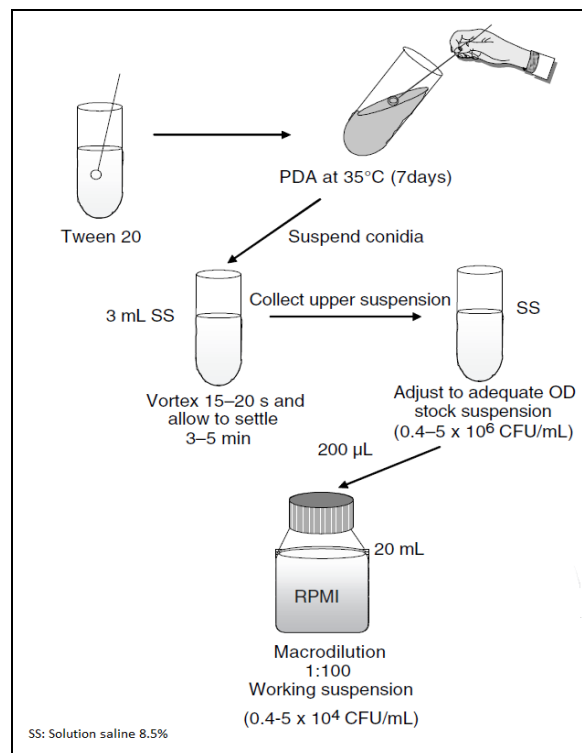


Figure n° 11 : Préparation des suspensions fongiques (inoculum) pour la méthode de macro-dilution en milieu liquide (Espinel-Ingroff et Cantón, 2007).

1.3.4 Inoculation des tubes CMI

Les tubes de l'antifongique devraient être organisés avant la préparation de l'inoculum dans l'ordre croissant, comprenant deux témoins, positif (contrôle de croissance) et négatifs

(contrôle de stérilité) pour chaque isolat. Commencer à inoculer les tubes CMI de la plus faible concentration de l'antifongique pour arriver à la plus forte concentration, y compris les témoins positifs. Ajouter 0.9 ml de la suspension de travail sur les tubes CMI ; mélanger cette suspension à l'aide d'un vortex avant l'étape d'inoculation. Notons que, chaque essai est répété deux fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

1.3.5. Incubation et lecture

Les tubes CMI sont incubés à 35 °C (sans agitation) dans des conditions d'aérobiose pendant 72 heures. Le témoin de croissance doit avoir une croissance suffisante. Si la croissance adéquate n'est pas présente, les tubes doivent être re-incubés une deuxième fois.

Cette croissance dépendra de l'espèce fongique testée. Enfin, déterminer le point final CMI par une lecture visuelle, en comparant la croissance à celle du témoin. La CMI est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique pour laquelle aucune croissance n'est visible (détection visuelle) comparativement au témoin.

1.3.6. Détermination de la CMF

Pour déterminer la CMF, inoculer en surface 20 µl de chaque tube CMI (sans agitation) sur le milieu Sabouraud Dextrose Agar (SAB) (Eur-Pharm, 1024.00), y compris tous les tubes qui ont montré une inhibition visuelle complète. Après incubation des boîtes à 35 °C pendant 72 heures, la CMF est considérée comme la concentration la plus faible d'antifongique qui indique soit une croissance nulle, soit une croissance de moins de trois colonies pour obtenir une activité fongicide d'environ 99 à 99.5%.

2. Résultats et discussion

2.1. Rendement et composition chimique des huiles essentielles

Selon la Figure ci-dessous le rendement le plus élevé en huile essentielle est celui de *M. spicata* avec 2.3% suivi de *T.vulgaris* (1.5%). Le *L.nobilis* présente le plus faible rendement avec 1.1%. Aggarwa et *al.* (2002) et Kokkini et *al.* (1997) ont rapporté que l'huile essentielle des feuilles et des tiges de *Mentha spicata* varie entre 0.16 à 3.35% de la matière végétale sèche. En ce qui concerne l'huile de *Thymus vulgaris*, le thym séché donne environ 1–2.5% d'huile essentielle par distillation à la vapeur. La plupart des matières volatiles détectées dans l'huile de thym appartiennent au groupe de monoterpène avec du thymol, un monoterpène phénolique, en tant que représentant principal (30–55%) (Stahl-Biskup et Venskutonis, 2004). Le rendement des feuilles de laurier en huile essentielle varie entre 1 à 3% (Simon et *al.*, 1984). Le constituant principal est le cinéol, qui représente environ 70% (Raviv et *al.*, 1983). Il existe, parfois, des similarités ou de différences entre nos résultats et ceux dans d'autres études en fonction de la qualité de matière végétale utilisée (Zekovic et *al.*, 2009).

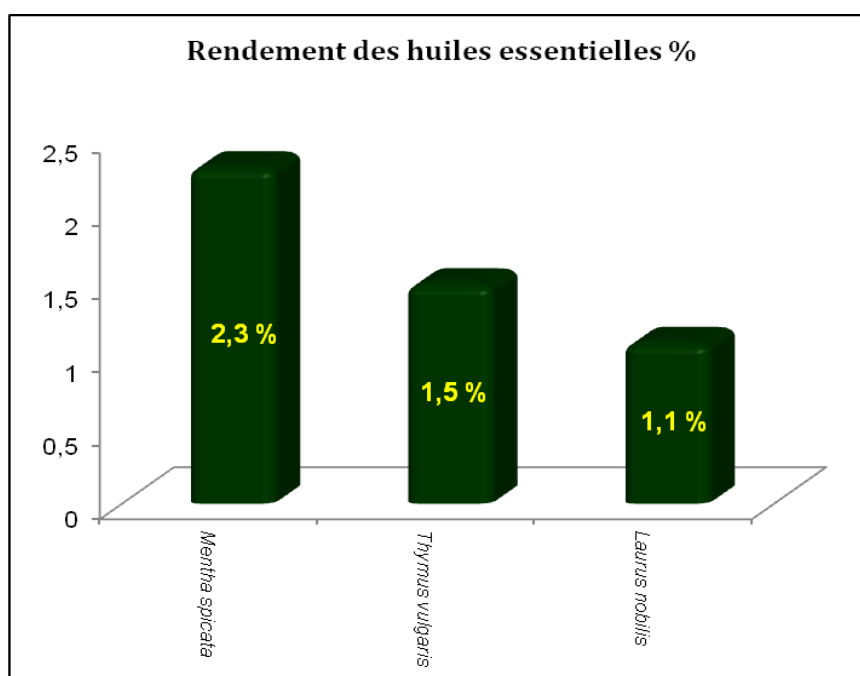


Figure n°12 : Rendement des huiles essentielles

Les analyses chromatographiques des huiles essentielles ont permis d'identifier 32 composés qui présentent environ 99.40% pour *M. spicata*, contre 20 composés (99.83%) pour *T. vulgaris* et 29 composés (98.62%) pour *L. nobilis* (voir Tableaux 7, 8, et 9).

Tableau n° 7 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha spicata*

N°	Temps de rétention	%	Composés	CAS
1	15,43	1,18	α -pinène	80-56-8
2	17,89	0,74	sabinene	3387-41-5
3	18,26	1,32	β -pinène	127-91-3
4	18,65	0,87	β -myrcene	123-35-3
5	21,12	21,56	D- limonène	5989-27-5
6	21,56	8,28	1,8-cinéole	470-82-6
7	22,46	0,35	δ -terpinene	99-85-4
8	23,61	0,96	<i>trans</i> -sabinene hydrate	17699-16-0
9	24,7	0,13	iso-pinocamphenol	27779-29-9
10	28,39	0,70	α -terpineol	98-55-5
11	28,62	1,14	4-terpineol	562-74-3
12	28,86	0,19	Borneol	10385-78-1
13	29,6	0,64	dihydrocarvone	5948-04--9
14	29,82	2,26	Carveol	38049-26-2
15	30,78	0,48	<i>trans</i> -carveol	1197-07-5
16	31,93	52,23	Carvone	99-49-0
17	32,73	0,07	Ledol	577-27-5
18	32,8	0,05	oxyde de carvone	36616-60-1
19	33,5	0,50	δ -elemene	339154-91-5
20	33,7	0,17	acétate de dihydrocarvyl	20777-49-5
21	33,85	0,03	acétate de myrtenyl	1079-01-2
22	34,99	0,09	<i>trans</i> - acétate de carvyl	1134-95-8
23	35,29	0,02	berbenone	80-57-9
24	35,58	1,16	β -bourbonene	5208-59-3
25	35,67	0,90	β -elemene	515-13-9
26	36,84	0,47	2-cyclopenten-1-one	488-10-8
27	36,98	2,29	caryophyllene	87-44-5
28	39,09	0,15	germacrene-D	23986-74-5
29	40,49	0,07	Calamenene	483--77-2
30	40,81	0,10	α -Muurolene	31983-22-9
31	43,58	0,13	Torreyol	19435-97-3
32	44,93	0,17	α -cadinol	481-34-5
Total		99.40		

Tableau n° 8 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

N°	Temps de rétention	%	Composés	CAS
1	15,45	1,29	δ-terpinene	99-85-4
2	16,66	1,00	camphene	79-92-5
3	18,65	0,45	β-myrcene	123-35-3
4	19,07	1,04	1-octen-3-ol	3391-86-4
5	21,05	3,79	Cymene	25155-15-1
6	25,25	78,06	linalool	78-70-6
7	27,68	0,59	camphor	76.22.2
8	29,36	0,40	α-terpineol	98-55-5
9	30,52	1,83	acétate de linalyl	115-95-7
10	31,52	0,94	Carvon	99-49-0
11	33,22	5,73	thymol	89-83-8
12	36,96	2,99	<i>trans</i> -caryophyllene	87-44-5
13	38,23	0,10	α-humulene	6753-98-6
14	39,05	0,27	germacrene-D	23986-74-5
15	40,77	0,10	acenaphthylene	83-32-9
16	42,37	0,07	germacrene D-4-ol	72120-50-4
17	42,74	0,87	oxyde de caryophyllene	1139-30-6
18	43,98	0,14	α-Selinene	473-13-2
19	44,91	0,13	α-cadinol	481-41-5
20	45,33	0,03	veridiflorol	552-02-3
Total		99.83		

Tableau n° 9 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*

N°	Temps de rétention	%	Composés	CAS
1	15,52	1,29	α -pinène	80-56-8
2	17,99	2,98	Sabinene	3387-41-5
3	18,34	2,06	β -pinène	127-91-3
4	21,04	0,86	D- limonène	5989-27-5
5	21,69	45,58	1,8-cinéole	470-82-6
6	24,88	8,53	Linalool	78-70-6
7	28,63	1,90	4-terpineol	562-74-3
8	29,41	2,76	α -terpineol	98-55-5
9	32,35	1,18	aceteate de bornyl	76-49-3
10	34,65	11,00	α -acetate de terpinenyl	80-26-2
11	35,44	2,69	Eugenol	97-53-0
12	37,08	14,04	Methyleugenol	93-15-2
13	38,28	0,12	α -carophyllene	6753-98-6
14	38,66	0,15	Cyclodecene	935-31-9
15	38,73	0,22	cis-3-methylene-cyclononene	66135-92-0
16	38,83	0,06	<i>trans</i> - α -bergamotene	13474-59-4 100762-46-7
17	39,55	0,33	bicyclogermacrene	7
18	40,39	0,66	Aromadendren	489-39-4
19	41,55	0,58	Elemicin	487-11-6
20	42,74	0,39	oxyde de caryophyllene	1139-30-6
21	43,1	0,21	β -selinene	17066-67-0
22	43,36	0,14	Ledol	577.27.5
23	43,91	0,03	α --bisabolol	515-69-5 999189-20-6
24	44,67	0,05	α -copaen-15-ol	6
25	44,9	0,23	α -cadinol	481-34-5 900150-05-1
26	45,04	0,18	Epiglobulol	1
27	45,25	0,21	Valerenol	84249-42-3 999188-91-4
28	45,58	0,07	δ -epoxy-elemene	4
29	45,9	0,12	cis- α -copaene-8-ol	58569-25-8
Total		98.62		

Les constituants majoritaires de l'huile essentielle de *M. spicata* sont : le carvone (52,23%), le D-limonène (21.56%) et le 1,8-cinéole (8.28%). D'autres composés sont également présents dans l'huile de menthe, mais à des teneurs moins importantes. Selon Khare (2007) les principaux constituants de d'huile essentielle de *M. spicata* étaient le carvone (55-75%), le limonène (jusqu'à 21.4%). kofidis et al.(2006), germacrene-D (1.5%) et 1,8-cinéole (4.0%). Sokovic et Griensven (2006) ont également rapportés que le carvone (49.52%), le menthone (21.92%), le limonène (5.77%) et le 1,8-cinéole (3.06%) sont les principaux composés identifiés dans l'huile

de *Mentha spicata* de Monténégro. D'après les résultats obtenus il existe plus de similarité dans la composition chimique de cette huile avec ceux déjà trouvés dans la littérature.

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est composée principalement de linalool (78.06%), de thymol (5.73 %) et de cymène (3.79 %) accompagnés d'autres constituants à des teneurs relativement faibles. De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thymus vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). L'hybridation facile de l'espèce mène à une grande variabilité intraspécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement d'extrait et sa composition en produits chimiques (Balladin et Headley, 1999 ; Amiot, 2005). Les biochimistes ont différenciés 6 chémotypes reposant sur les proportions fluctuantes de leurs constituants aromatiques: le carvacrol, le géraniol, le linalool, le terpineol, le thymol, le thuanol (Bernard, 1997).

Le *Laurus nobilis* contient comme principaux constituants le 1,8-cinéole (45.58%), le méthyleugénol (14.04%), le α -acétate de terpinényl (11%) et le linalool (8.53%). Les principaux composés actifs de l'huile de laurier entraîné appartiennent aux monoterpènes et aux terpènes. Les constituants majeurs 1,8-cinéole (24.84%), le linalool (14.46%), l'acétat de terpinéol (12.36%) et de l'eugénol de méthyle (10.09%) (Caredda et al., 2002). Putievsky et al. (1984) ont trouvé que le pourcentage le plus élevé de 1,8 cinéole est atteint au printemps et le plus faible en été, mais d'autres produits chimiques comprennent l'eugénol, linalool, l'eugénol méthyle, le géraniol, le geranyl et les esters eugényles, le terpineol, le pinène, et le β -phellandrene sont également présents mais à des teneurs moins importantes (Farrell, 1985). On remarque, alors que nos résultats sont proches aux certains travaux réalisés sur la même plante.

2.2. Effet antifongique des huiles essentielles

Le Tableau ci-dessous montre les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles de *M. spicata*, *T. vulgaris* et *L. nobilis* contre les champignons testés

Tableau n° 10 : Activité antifongique (CMI, CMF) des huiles essentielles de *M. spicata* *T. vulgaris* et *L. nobilis*

Souches fongiques	<i>Mentha spicata</i>		<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Laurus nobilis</i>	
	CMI*	CMF*	CMI*	CMF*	CMI*	CMF*
<i>Fusarium graminearum</i> MUCL 53452	2.5	2.5	10	10	10	10
<i>Fusarium moniliforme</i> MUCL 53645	2.5	2.5	10	20	10	20
<i>Penicillium citrinum</i> MUCL 31475	5	10	10	20	20	20
<i>Penicillium expansum</i> MUCL 29192	2.5	2.5	10	10	10	10
<i>Aspergillus niger</i>	5	10	20	>20	20	20
<i>Alternaria</i> sp.	10	10	10	20	20	20

* la CMI (concentration minimale inhibitrice) et la CMF (concentration minimale fongicide) sont déterminées par la méthode de macro-dilution en milieu liquide et exprimées en µl/ml (v/v)

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de *Mentha spicata* a exercé une forte activité antifongique. La concentration de 10 µl/ml (v/v) est suffisante pour inhiber la croissance de l'*Alternaria* sp. et la concentration 5 µl/ml (v/v) est suffisant pour inhiber la croissance de l'*Aspergillus niger* et *Penicillium citrinum*. Alors que, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* et *Penicillium expansum* sont plus sensibles pour une concentration inhibitrice de 2.5 µl/ml (v/v). L'effet fongicide de cette huile est détecté à la concentration 10 µl/ml (v/v) pour *Penicillium citrinum*, *Alternaria* sp et *Aspergillus niger*. *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium expansum* sont des espèces plus sensible à l'huile de *Mentha spicata* où la concentration fongicide égale 2.5 µl/ml (Cf. Annexe 1).

Très peu d'études ont examiné l'activité antifongique des huiles essentielles de *Mentha spicata* contre les diverses maladies fongiques. Cependant, le Carvone (p-mentha-6, 8-dien- 2-one) est le constituant principal de *Metha spicata*. Il a des utilisations potentielles pour inhiber la croissance des bactéries (Helander et al., 1998), des champignons (Smid et al., 1995), et en tant que répulsif contre les insectes

(Lee et al., 1997). Dans la présente étude, le carvone (52.23%) caractérise la composition de l'huile essentielle de *Mentha spicata* avec d'autres composés comme D-limonène (21.56%) et 1,8-cinéole (8.28%). Cette huile a exercé une forte activité antifongique contre *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum* (2.5 µl/ml). Par contre la concentration de 10 µl/ml (v/v) de l'huile de menthe est suffisante pour exercer un effet fongicide contre les souches *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger* et *Alternaria* sp. Similairement, Bader et al. (2007) qui ont déclaré que le carvone est le principe actif qui montre une meilleure activité antimicrobienne de l'ensemble de l'huile. Adam et al (1998) ont également signalé une forte activité antifongique de carvone et de carvéol. Cependant, d'autres huiles essentielles de *Mentha spicata* ont exercé des degrés variables d'activité antifongique contre les champignons phytopathogènes (Muller-Riebau, 1995) et kératinophyles (Kishore et Mishra, 1993). Ocak et al. (2012) ont rapporté que l'huile essentielle d'*Origanum hypericifolium* est active contre 14 champignons isolés de noisettes et de noix qui sont complètement inhibés (100 %) au bout de 3–6 jours. Cette activité inhibitrice est en corrélation avec la présence de composants aromatiques, tels que monoterpènes, le carvacrol, le thymol et le p- cymène.

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* est moins active par rapport à l'essence de *Mentha spicata*. La concentration de 20 µl/ml (v/v) est suffisante pour inhiber la croissance d'*Alternaria* sp, *Aspergillus niger* et *Penicillium citrinum*. Alors que *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium expansum* sont plus sensible pour une concentration de 10 µl/ml. L'effet fongicide de cette huile est détecté à la concentration 20 µl/ml pour l'*Alternaria* sp, *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* et *Fusarium moniliforme*. *Fusarium graminearum* et *Penicillium expansum* sont les espèces les plus sensibles à l'huile de laurier où la concentration fongicide égale 10 µl/ml (Cf. Annexe1). L'activité antifongique de *L. nobilis* est fortement liée à la présence de 1,8 cinéole et eugénol dans la composition d'huile. Dans cette étude, l'huile essentielle de *Laurus nobilis* contient comme principaux constituants le 1,8-cinéole (45.58%), le méthyleugénol (14.04%). De nombreuses études ont montré que les propriétés antimicrobiennes des principaux constituants le carvacrol, le trans-anéthol et le 1,8-cinéole sont capable de supprimer plusieurs champignons phyto-pathogènes. Les feuilles de laurier fournissent environ 10–30 ml/Kg (1-3%) d'huile essentielle (Bruneton 1999, Demir et al., 2004) dont les

constituants majoritaires inclut : cinéol, α et β pinène, sabinène, linalol, eugénol, terpinéol, plus d'autres esters et terpenoïdes, mais dont les proportions varient selon l'origine géographique (Iserin 2001 ; Sayyah et *al.*, 2002 ; Demir et *al.*, 2004). Atanda et *al.* (2007) ont rapporté que l'huile des feuilles de laurier stimule *In vitro* la croissance des mycéliums d'*A. parasiticus* CFR 223, mais réduit la concentration de son aflatoxine de 55.21%. Récemment, Fawzi et *al.* (2009) ont testé *in vitro* cinq extraits de plantes contre les champignons pathogènes *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum* et qui ont constaté que *L. nobilis* peuvent être utilisés avec succès pour le contrôle antifongique. Ils ont conclu que l'utilisation d'extraits de plantes pour lutter contre les champignons pathogènes peuvent réduire la dépendance des fongicides synthétiques. Türkölmez et Soylu (2014) ont montré que la croissance du mycélium de *Rhizoctonia solania* est, cependant, complètement inhibée par l'huile essentielle *L. nobilis* à une concentration relativement élevée (200 μg / ml d'air). Parmi les espèces de champignons testées, *Macrophomina phaseolina* est l'agent pathogène fongique la plus sensible à l'huile essentielle de *L. nobilis*.

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* présente la plus faible activité antifongique contre *Aspergillus niger* par rapport à l'essence de *Mentha spicata* et *Laurus nobilis*. L'*Aspergillus niger* a été inhibé à partir d'une concentration de 20 $\mu\text{l/ml}$ (v/v), donc l'huile de Thym n'est montré aucun effet fongicide sur ce champignon (CMF >20 $\mu\text{l/ml}$). *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium expansum*, *Penicillium citrinum* et *Alternaria* sp, sont plus sensible pour une concentration inhibitrice de 10 $\mu\text{l/ml}$ (v/v). L'effet fongicide de cette huile est détecté à la concentration de 10 $\mu\text{l/ml}$ pour *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum*. Par contre la concentration 20 $\mu\text{l/ml}$ est suffisante pour exerce un effet fongicide sur *Alternaria* sp., *Fusarium moniliforme*, *Penicillium citrinum*. Cependant, l'*Aspergillus niger* montre une résistance considérable à l'égard de cette huile (Cf. Annexe1). La caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée du thymol (Guillén et Manzanos, 1998 ; Balladin et Headley, 1999 ; Hudaib et *al.*, 2002 ; Bouhdid et *al.*, 2006) . Il s'est avéré que le thym (carvacrol 80%) a montré une activité inhibitrice particulièrement élevée contre la croissance fongique et la sporulation d'*Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Penicillium expansum* (inouye et *al.*, 1998). Selon les travaux de Nguefack et *al* (2004), l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* réduit de 81% la croissance de *Fusarium moniliforme* à 0.2 $\mu\text{l/ml}$

(v/v) et l'*Aspergillus flavus* à 0.3 ul/ml (v/v). La différence de concentration minimale inhibitrice (CMI) de la même plante sur la même espèce du champignon peut être due à une différence de la composition chimique d'huile essentielle. Les activités élevées des huiles d'origan et de thym due à la présence de thymol et de carvacrol (Baratta et al., 1998), tandis que l'activité des huiles telles que la coriandre et le romarin peut être attribué aux composants non- phénoliques avec un antibactérien actif connu tels que le linalool et le 1,8- cinéole (Maruzzella et al., 1960). Selon Robet (2004), la composition chimique peut être variée en fonction du chemotype. Il est donc très important de bien définir le chemotype d'huile essentielle de la plante. L'efficacité d'huile essentielle dépend de leurs composition chimique qui elle-même varie avec chaque espèce. Des études réalisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1999) ont montré que le thymol possède une forte activité antifongique et antibactérienne contre de nombreuses espèces, y compris *Aspergillus* sp. En outre, Markovic et al. (2012) ont montré que le thymol et le carvacrol sont des antifongiques potentiels avec une grande efficacité sur la croissance des *Aspergillus* sp et des *Penicillium* sp. Bouddine et al. (2011) ont également montré que la croissance d'*Aspergillus niger* est complètement inhibée par le carvacrol et le thymol à une concentration de 0.025 %. Par contre, les résultats de nos travaux expliquent le faible pouvoir antifongique de l'extrait de *Thymus vulgaris* (linalool 78.06%) observé dans cette étude particulièrement contre *Aspergillus niger* (>20 µl/ml). Cette huile a présenté la plus faible activité antifongique contre *Aspergillus niger* comparée à l'essence de *Mentha spicata* et de *Laurus nobilis*. Selon les travaux de Paster et al. (1995), les huiles essentielles de *Origanum vulgarire* (thymol 54%, carvacrole 5%) et de *Coridothymus capitatus* (thymol 41%, carvacrol 4%) ont été appliquées pour 24 heures comme fumigènes contre les mycéliums et les spores d'*A. flavus*, d'*A. niger* et d'*A. ochraceus* dans une enceinte de 3.4 litres. La CMI de l'huile d'origan capable à empêcher la croissance mycélienne est de 2.0 µl/l. Par contre, l'huile essentielle de Thym est moins efficace car la croissance est observée même à 4.0 µl/l. La variabilité des résultats est due à l'influence de plusieurs facteurs tels que les méthodes d'analyse, les microorganismes testés et les huiles essentielles utilisées (Pattnaiks et al., 1996).

Les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles des trois plantes aromatiques en milieu liquide montrent que l'*Aspergillus niger* est le champignon le plus résistant par rapport aux autres champignons. L'huile essentielle *Mentha spicata* a exercé une forte activité fongicide contre l'*Aspergillus niger*, suivi de *Laurus nobilis* et de *Thymus vulgaris* pour des concentrations de 10, 20, >20 µl/ml (v/v), respectivement. *Fusarium graminearum* et *Penicillium expansum* sont les espèces les plus sensibles aux huiles essentielles utilisées. L'effet fongicide sur ces deux champignons est détecté à la concentration de 2.5 µl/ml pour huile de menthe et de 10 µl/ml (v/v) pour les autres huiles. La concentration de 20 µl/ml (v/v) de chaque huile est suffisante pour exercer un effet fongicide contre le reste des souches fongiques testées.

La bioactivité des huiles essentielles est influencée par leur composition chimique, qui est variable selon la saison, les méthodes d'extraction, les états écologiques (Isma et al., 2007), et la partie de la plante utilisée ainsi que l'âge de la plante et la période du cycle végétatif, ou même les facteurs génétiques (Kokkini et al., 1997 ; Russo et al., 1998 ; Thompson et al., 2003 ; Karousou et al., 2005). De plus, les travaux de Sefidkon et al.(2008) ont confirmé l'effet des facteurs climatiques et les techniques de l'extraction sur la variation de la composition chimique d'huile essentielle de la même plante.

En présence d'huile essentielle, la diminution de la croissance de champignon pourrait expliquer par la présence dans ces huiles des composés terpéniques, qui possèdent une activité antifongique. Le mécanisme d'action des huiles essentielles contre des mycètes, jusqu'à maintenant, n'est pas totalement élucidé, mais quelques auteurs ont donné plusieurs suppositions selon leurs observations (Kwouzou et al., 2009). La plupart des études sur le mécanisme d'action des huiles essentielles se sont accentuées sur leurs effets sur la membrane cellulaire (Bouguerra, 2012). Ourain et al, (2005) ont montré qu'à cause de la complexité de la composition chimique des huiles essentielles, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action. Donc, chaque un des constituants d'une huile essentielle à son propre mécanisme. Par conséquent, l'huile essentielle de *Citrus sinensis*, qui présente une forte richesse en limonène (84,2 %), antifongique exercé une forte activité contre *Aspergillus niger* par la destruction de ses parois cellulaires mycéliens (Sharma et Tripathi, 2008). De plus,

Plusieurs auteurs, notamment de Sharma et Tripathi (2008), Billerberk *et al.* (2001) et Mares *et al.* (2004) ont constaté que les huiles essentielles peuvent causer des changements morphologiques comprenant l'insuffisance de sporulation, la perte de pigmentation, le développement anormal des conidiophores et la déformation des hyphes.

Enfin, L'effet antifongique des huiles essentielles est dû essentiellement à la nature de leurs composés majeurs mais en partie à la nature de leurs composés mineurs. Des phénomènes de synergie entre les différents constituants peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible par les composés majoritaires (Senhaji *et al.*, 2006).

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

L'étude de la composition chimique et de l'activité antifongique des huiles essentielles de trois plantes aromatiques *Mentha spicata*, *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* nous a permis d'identifier 32 composés qui représentent environ 99.40% pour *Mentha spicata*, contre 20 composés (99.83%) pour *Thymus vulgaris* et 29 composés (98.62%) pour *Laurus nobilis*. Les composés majoritaires de l'huile de *M. spicata* et de *T. vulgaris* sont respectivement le carvone (52,23%) et le linalool (78.06%), tandis que l'huile de *Laurus nobilis* a montré une dominance de 1,8-cinéole (45.58%).

De plus, les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles des trois plantes aromatiques en milieu liquide montrent que l'*Aspergillus niger* est le champignon le plus résistant par rapport aux autres souches fongiques testées. L'huile essentielle de *Mentha spicata* a exercé une forte activité fongicide contre l'*Aspergillus niger*, suivi de *Laurus nobilis* et de *Thymus vulgaris* pour des concentrations de 10, 20, >20 µl/ml (v/v), respectivement. *Fusarium graminearum* et *Penicillium expansum* sont les espèces les plus sensibles aux huiles essentielles utilisées. L'effet fongicide sur ces deux champignons est détecté à la concentration de 2.5 µl/ml pour l'huile de menthe et de 10 µl/ml (v/v) pour les autres extraits. La concentration de 20 µl/ml (v/v) de chaque huile est suffisante pour exercer un effet fongicide contre le reste des souches fongiques testées.

L'étude présente également un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire car elle propose d'une part l'utilisation des huiles essentielles dans ce secteur comme des biofongicides afin de réduire la dépendance des fongicides synthétiques et de garantir une meilleure production agricole, et d'autre part la création des pépinières pour la valorisation des plantes aromatiques et la disponibilité des biofongicides sur le marché des fongicides. De plus, elle suggère également l'application d'une combinaison de deux ou plusieurs huiles essentielles comme des antifongiques naturels dans l'industrie agroalimentaire, car chaque extrait de plante inactive efficacement une souche fongique spécifique.

Enfin et pour faire suite à cette étude, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées comme perspectives :

- Etudier *in situ* l'effet antifongique des huiles essentielles sur la croissance des moisissures phytopathogènes ;
- Réaliser des études toxicologiques sur les huiles essentielles avant leur application comme des biofongicides dans les cultures agricoles ;
- Etudier l'effet insecticide des huiles essentielles sur le développement des insectes responsables de la détérioration des céréales, des légumes et des fruits ;
- Appliquer *in planta* les essences végétales pour le traitement de la maladie du Bayoud causée par *Fusarium oxysporum* sp. *Albedinis*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdoulayes, K. 2012. *Sécurité alimentaire et organisation agricoles et rurale au Mali*. Paris: Harmattan. 158p.
- Abramson, C.I., Wanderley, P.A., Wanderley, M.J.A., Silva, J.C.R., Michaluk, L.M. 2007. The Effect of essential oils of sweet fennel and pignut on mortality and learning in Africanized Honeybees (*Apis mellifera* L.) (*Hymenoptera: Apidae*). *Neotropical Entomology*, 36: p. 828-835.
- Adam, K., Sivropoulol, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.*, 45: p.1739–1745.
- AFSSA. 2006. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique.
- Aggarwal, K., Khanuja, S., Kumar, S., et al. 2002. activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Fragr Flav. J.*, 17: p. 59-63.
- Aliou, D., Gruz, J. 1989. *Génie agricole et développement technique d'entreposage (Butin des sévices agricoles de la FAO)*. FAO. 127p.
- Amiot, J. 2005. *Thymus vulgaris, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaire*. Thèse de doctorat : Ecole nationale supérieure d'Agronomie de montpellier.
- Anton, R., Lobstein, A. 2005. *Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Paris : Tec & Doc. 522p.
- Aprotosoiaie, A.C., Spac, A.D., Hancianu, M., Miron, A., Tanasescu, V.F., Dorneanu, V., Stanescu, U. 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58 : p. 46-54.
- Atanda, O.O., Akpan, I., Oluwafemi, F. 2007. The potential of some spice essential oil in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control*, 18: p. 601-607.

- Bader, A., L. Panizzi, L., Cioni, P.L and Flamini, G. 2007. Achillea ligustica: composition and antimicrobial activity of essential oils from the leaves, flowers and some pure constituents. *Cent. Europ. J. Biol*, 2: p. 206–212.
- Badillet, G., Briève, C., Guého, E. 1987. *Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes*. Atlas clinique et biologique. Vol 2. Ed VARIA. Paris.
- Balladin, D.A; Headley, O. 1999. Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linné) herlos. *Renewable Energy*, 17: p. 523-531.
- Baratta, M.T., Damien Dorman, H.J., Stanley, G., Deans, D.M., Biondi., Ruberto, G. 1998. Chemical composition antimicrobial and antioxidant activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J. Essent. Oil. Res*, 10: p.618-627
- Barla, A., Topçu G., Öksüz, S., Tümen, G., Kingston, D.G.I. 2007. Identification of cytotoxic sesquiterpènes from *Laurus nobilis*. *Food chemistry*. 104. p. 1487-1484.
- Barry, N. 2001. Art d'extraire les huiles essentielles. p. 125-128.
- Beloued, A. 2005. *Plantes médicinales d'Algérie*. Office des publications universitaires. Alger. p. 124.
- Belyagoubi, L. 2006. *Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales*. Thèse magistère : Université Abou Becker Belkaid. 110p.
- Beneteaud, E. 2011. *Document ressource*. Source : comité française du parfum.
- Benini, C. 2007. *Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores*. Mémoire d'ingénieur. Université Gembloux. 109p.
- Bernard, C.B. et Philogène B.J.R., 1993. Insecticide synergists: role, importance and perspectives. *J. Toxicol. Env. Health*, 38: p.19-22.
- Bernard, B. 1997. *Dictionnaire plante médicinale du monde*. Paris : Estema. 643 p.
- Bernard, B. 2001. *Dictionnaire plante médicinale du monde : croyance et réalité*. Paris : Estema. 645p.

- Bernard, G., Bénézra, Y. 2002. *Plante et réaction cutanée*. France: Jpn Gibbly. 157p.
- Besombes, C. 2008. *Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées*. Thèse de doctorat : Université de La Rochelle. 289p.
- Billerbeck, V.G., Roques, C., Vanière, P., Marquier, P. 2001. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygienes*, 3: p. 248-251.
- Botton, B., Breton, A., Fèvre M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. 1990. *Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle*. Ed. Masson. Paris.
- Bouddine, L., Louaste, B., Achahbar, S., Chai, N ., Chamri, F., Remmal, A. 2011. Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. *Afr J Biotechnol*, 11 : p.140-149.
- Bouguerra, Y. 2012. *Etudes des activités biologiques des huiles essentielles extraites des graines de Foeniculum vulgare Mill. En vue de son utilisation comme conservateurs alimentaire*. Thèse magistère : Université Montori Constantine. 128p.
- Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Bouhdid, D., Skali, N. S., Abrini, J. 2006. *Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities*. *Biochimie*. Substances Naturelles et environnement, Congrès Intrntional de biochimies, Agadir. p. 324-327.
- Bouix, M., Leveau, J-Y. 1993. *Microbiologie Industrielle- les micro-organismes d'intérêt industrielle.2 : Les moisissures*. Paris : Tec&doc-Lavoisier. 612 p.
- Bourrel, C. 1993. *Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées*. Thèse de l'Institut National Polytechnique de toulouse. Toulouse, France.
- Bruneten, J. 1993. *Pharmacognosie : phytochimie, plants médicinales*. Paris : Tec &Doc Lavoisier. p .915.

- Bruneton, J. 1999. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, monoterpènes et sesquiterpènes* 3^{ème} édition. Paris : Tec & Doc Lavoisier. p. 484-497.
- Cahagnier, B., 1998. *Moisissures des aliments peu hydratés*. Lavoisier Tec et Doc. Paris. 226p
- Caredda, A., Marongiu, B., Porcedda, S., Soro, C. 2002. Supercritical carbon dioxide extraction and characterization of *Laurus nobilis* essential oil. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 50: p.1492–1496.
- Carson, C.F., Rilley, T.V., Bosque, F. 2002. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of applied Bacteriology*, 78: p. 264-269.
- Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A. 2002. *Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans La sécurité alimentaire du consommateur*. Lavoisier. Tec&Doc. p. 145.
- Chao, S.C, Young, D.G., Oberg, G.J. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected Bacteria. Fungi and viruses. *Journal of Essential oil Research*, 12: p. 639-649.
- Charabot, E., Dupont, J., Pillet. 1899. *Les huiles essentielles et leurs principaux constituants*. Ch. Beranger, Paris.
- Chermette, R., Bussieras, J. 1993. Parasitologie vétérinaire. Mycologie. Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- Chowdhury, J.U., Mobarok, H., Bhuiyan, N.I., Nandi, N.C. 2009. Constituents of essential oils from leaves and seeds of *Foeniculum vulgare Mill.* cultivated in bangladesh. *Bangladesh J. Bot*, 38: p.181-183.
- Christensen, C.M., Meronuk, R.A., Sauer D.B. 1982. Microflora. Chapitre 9. In : *Storage of cereal grains and their products* (Christensen, C.M. Ed), American Association of cereal Chemists, St. Paul. p. 219-240.
- Christine, R. 2010. *Production Bio : de quelle qualité parle*. France : Educagie. 216p.
- Claude, R. 2004. *Santé et qualité de l'environnement intérieur dans les bâtiments*. 1^{ier} édition. Italie: PPVR. 358p.

- Cox, S.D., Gustafson, J.F., Warmington, J.R., wyllie, S.G. 1991. *in vitro* antimicrobial Activity and chemical composition of *Malaleuca alternifolia* essential oils. *Journal of Applied Microbiology*,88: p.170-175.
- Cox, S.D.,Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.F., Warmington, J.R., wyllie, S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tee tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88 : p. 160-170.
- Crouzet, J. 1996. Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur. F 4 100. Paris.
- Daniel, M. 2006. *Medicinal plants chemistry and propriety. America*: Science publishers. 250p.
- Daniel, R., Chaurmont, J., Cleur,C., et al. 2008. *Conseilles en aromathérapie*. 2^{ème} édition France : Wolters kluwer. 187p.
- Daniel, R., Olide, C. 2007. *Botaniques pharmacognosies phytothérapies*. 3^{ème} édition. France: Wolters Kluwer. 145 p.
- Davidson, P.M. 1997. Methods for testing efficacy of food antimicrobial. *Food technology*,43: p.148-155.
- Demir, V., Guhan, T., Yagcioglu ,A.K., Ddegirmencioglu, A. 2004. Mathematical modeling and the Determination of some Quality Paramaters of Air-dried Bay leaves. *Biosystems Engineering*,88 : p.325-335.
- Désilets H., Coulombe J., Gill J., 1996. La répression du *Phytophthora infestans* dans les tissus végétaux lors du défannage thermique de la pomme de terre. Symposium : *Lutte physique en phytoprotection*, 88e Assemblée annuelle de la Société de protection des plantes du Québec. 6-7 juin 1996. Québec.
- Dugo, G., Di Giacomo, A. 2002. *Citrus: The genus Citrus*. London : Taylor & Francis Publishing. 157p.
- Ermest, S. 2001. *Herbes culinaires pour nos jardins de pays froid*. Canada: CNRC. 195p.
- Espinel-ingroff, A., Caton, E. 2007. Antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. In: Schwalbe, R., Steele-Moore, L & Goodwin, A. C (Eds), *Antifungal susceptibility testing protocols* .USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, p.210-240.

- FAO, 1995. N°27. Les sorghos et les mils dans la nutrition humaine.198p.
- FAO. 2003. *Manuel du système de l'analyse des risques-points critiques pour leurs maitrises (HACCP) pour la prévention et contrôle des mycotoxines* .92p
- Farrell, K.T. 1985. *Spices, condiments, and seasonings*. USA : AVI Publishing Co.Westport, CT. 415p.
- Fawzi E.M., Khalil A.A., Afifi A.F. 2009. Antifungal effect of some plant extracts on *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. *Afr. J. Biotechnol*, 8 : p.2590-2597.
- Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Chemat, F. 2007. Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave “dry” distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 22 : p. 494-504.
- Fillatre, Y.2011. *Produits phytosanitaires : développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem*. Thèse de doctorats : universités Angers. 288p.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U. 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: p. 85-102.
- Franchomme, P., Pénoel, D., Reverdy, M.E.1990. *Clefs pour l'aromathérapie. la molécule aromatique : matière, énergie, information*. l'aromathérapie exactement. R.J. Editeur. Limoges.2 .p .73-227.
- Garnéro, J. 1991. *Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation*. Ed. Encyclopédie des médecines naturelles. Paris. France. p. 2-20.
- Gary, A. 2007. *The herbalist in the kitchen*. America: Board of trustees. 235p.
- Giordain, R., Kaloustin, J. 2006. Action anticandidosique des huiles essentielles : leurs utilisations concomitantes avec des médicaments antifongiques. *Phytopharmacologie*, 3 : p.121-124.
- Giroux, S., Côté J.C., Vincent C., Martel P., Coderre D., 1994. Bacteriological insecticide M-One effects on the mortality and the predation efficiency of adult spotted lady beetle *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Econ. Entomol*, 87 : p. 39-43.

- Godon, B., Loisel W. 1997. *Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales*. 2^{ème} édition. Tech & Doc. Paris. 819p.
- Guillén, M. D., Manzanos, M. J. 1998. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. *Food chemistry*, 63: p. 373-383.
- Gury, P. 1997. *Maladies d'élevages des porcs*. France: France agricole. 210p.
- Helander, I., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., et al. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: p. 3590-3595.
- Hesselline, 1976. *Quelques problèmes rencontrés au cours de l'obtention, du contrôle et de l'étude de la composition d'une huile essentielle*. Rivista Italiana EPPOS. p. 105-125.
- Hettiarachichi, D.S. 2008. Volatile oil content determination in the Australian sandalwood industry: Towards a standardised method. *Sandalwood Research Newsletter*, 23: p. 1-4.
- Homsy, M. 2009. *Progrès en dermato-allergologie*. France : John Eurotexte. 393 p.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02011.x>.
- Huang et al., 1987. *Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées*. Thèse de doctorat : Université de La Rochelle, 41p.
- Hudaib, M., Speroni, E., Pietra, A. M. D., Carvin, V. 2002. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during vegetative cycle. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29: p. 691-700.
- I.A.R.C. 1993. Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human*, World Health Organization, Lyon, France.
- Inge, G. 2004. *Protection des céréales et de légumineuses stockées*. Pays Bas: Fondation Agromisa Wageningen. 1^{ier} édition 1996, 2^{ème} édition 2004. 74p.
- Inouye, S. 2003. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (part 1). *International journal of Aromatherapy*, 45: p. 22-35.

- Inouye, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y., Takeo, K., M., Yamaguchi, H. 1998. Antisporulation and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. *Mycoses*, 41 : p.403-410.
- Iserin, P. 2001. *Encyclopédie des plantes médicinales*. 2^{ème} Ed. Larousse. Londres. p. 225-226.
- Isma, M.B., Machial, C.M., Miresmailli, S., Bainard, L.D., 2007. Essential oil-based pesticides: new insights from old chemistry. p. 201-209.
- Jarvis, B.B. et Miller, J.D., 2005. Mycotoxines as harmful indoor air contaminants. *Applied microbiology and Biotechnology* 66: p.67-372.
- Jeane-Marc, et al. 2011. *Sources actuelles et futures du médicament-chimie du médicament* (cours+QCM). Elsevier Masson. 239 p.
- Jouany, J.-P., Yiannikouris, A. 2002. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA Productions Animales*, 15 : p.3-16.
- Kalimouni, C. 2010. *Caractérisation chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées*. Thèse doctorats : Universités de Toulouse. 263p.
- Kaloustian, J., El-Moselhy T. F., Portugal H. 2003. Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*). *Therm. Ochimica. Acta*, 401: p. 786.
- Karousou, R., Koureas, D.N., Kokkini, S. 2005. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Photochemistry*. 66: p. 2668-2673.
- Keon, D., Proost, C. 2002. *L'impact de la nutrition sur la sante*. Belgique: Garant. 221p.
- Khare, C. 2007. *India medicinal plants: An illustrated dictionary*. Paris: Springer.351p.
- Khelil, M.A. 1977. Influence de la chaleur utilisée comme moyen de lutte contre le bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* Say (*Coleopterae: Bruchidae*) sur les différents états et stades de développement. Thèse Ing. Agr.INA. p.77.
- Kimball, D.A. 1999. *Citrus processing: A complete guide*. 2^{ème} édition. Aspen publication inc., Maryland.p. 435.

- Kishore, N., Mishra, A., Chansouria, J. 1993. Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes. *Mycoses* 36 : p. 211-215.
- Kofidis, G., Bosabalidis, A. and Kokkini, S. 2006. Seasonal variations of essential oils in a linalool-rich chemotype of *Mentha spicata* grown wild in Greece. *Journal of Essential Oil Research*. 16 : p. 469-472.
- Kwouzou, N., Jazet, D., Tatsadjieu, L., et al. 2009. Propriétés antifongiques des huiles essentielles de quelques plantes du genre *Aframomum de Cameroun* contre *Aspergillus flavus*. *Cameroon journal of experimental*, 5 : p. 44-51.
- Lahlou, M. 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18: p. 435-448.
- Laurence, A., Nathahie, L. 2009. *Agriculture biologique : grande principe de la production*. France: Educagri. 239 p.
- Lee, S., Tsao, R., Peterson, C., Coats, J.R. 1997. Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn root worm (*Coleoptera: Chrysomelidae*), two spotted spidermite (Acari: *Tetranychidae*) and Housefly (Diptera: *Muscidae*). *Journal of Economic Entomologie*, 90: p.883-892.
- Lis-Balchin, M. 2002. *Lavender: the genus Lavandula*. Taylor and Francis. London. p. 155-200.
- Loupy, A. 2006. *Microwaves in Organic Synthesis*. 2^{ième} édition, Tome I et II. Wiley VCH, Weinheim.
- Lucchesi, M. E. 2005. *Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles*. Thèse de doctorat. Université de La Réunion.
- Lydie, S. 2010. *La lutte biologique : vers de nouveaux équilibres écologiques*. Paris : Quae et Educagri. 328p.
- Magan, N., Olsen, M. 2004. *Mycotoxines in food: Detection and control*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. p. 190-203.
- Magan, N., Lacey, J. 1988. Ecological determination of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology*, 7 : p. 245-256.
- Maihebau, P. 1994. *La nouvelle aromathérapie : biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs*. Lausanne. p .635.

- Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., Romagnoli, C. 2004. Antifungal activity of *Tagetes patula* on some phytopathogenic fungi ultrastructural evidence on *Phytophthora ultimum*. *Microbiol. Res*, 859 : p. 295-304.
- Markovic, T., Chatzopoulou, P., Šiljegović, J., Nikoli, N., Glamoclija, J., Čirić, A et al. 2012. Chemical analysis and antimicrobial activities of the essential oils. *Paris Apria*. V. 2. p.76.
- Maruzzella, J.C., Scrandis, D.A., Scrandis, J.B and Grabon, G. 1960. Action of odoriferous organic chemicals and essential oils on wood-destroying fungi. *Plant Dis. Rept*, 44: p. 789-792.
- Marzoukia, H., Elaissib, A., Khaldic, A., Bouzidd, S., Falconerie, D., Marongiu, B., Pirasa, A., Porcedda, S. 2009. Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *The Open Natural Products Journal*, 2: p. 86-91.
- Mills, J.T. 1990. Mycotoxins and fungi on cereal grains in western Canada. *Can. J. physiol. Pharmacol*, 68: p. 982-986.
- Mohamed, N.A.B., 2005. *Study on important parameters affecting the Hydro-distillation for ginger oil production*. Master Thesis: Universiti Teknologi Malaysia, 172p.
- Mohammad, S., Abu-Dieyeh, Z.H.M. 2009. Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *Int. J. Agric. Biol*, 11 : p.59-63.
- Mohammedi, Z. 2006. *Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de*. Thèse magistère : Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 155p.
- Molinié, A., Pfohl-Leskowicz, A. 2003. *Les mycotoxines dans les céréales : les points importants de contrôle de la production au stockage, le devenir dans les produits dérivés*. Laboratoire de Toxicologie et sécurité alimentaire-Auzeville – Tolosane. *Notes de l'ASEDIS-SO N°spécial Mycotoxines(2003)*. p9.
- Moll, M., Moll, N. 1995. Sécurité Alimentaire du consommateur. Chapitre 3 : les mycotoxines : des contaminants omniprésents dans l'alimentation humaine et animale, risque et prévention. p. 300.

- Morales, R. 2002. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: *Thyme : the genus Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London. p. 1-43.
- Morin, O. 1994. *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.
- Muller-Riebau, F., Berger, B., Yegen, O. 1995. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plant growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 43: p. 2262-2266.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. Pennsylvania state Univ. editor.
- Ocak, I., Celik, A et al .2012. Antifungal activity and chemical composition of essential oil of *Origanum hypericifolium*. *Int J Food Prop*, 15: p. 38-48.
- Olle, M., Bender, I. 2010. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*, 8 : p. 687-696.
- Olsson, J. 2000. *Modern Methods in Cereal Grain mycology*. Doctoral thesis: Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Microbiology Uppsala. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Agraria 241. p.37.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 1999. *Monographs on selected medicinal plants*. Geneva, Switzerland: OMS.
- Ormeno, E., Fernandez, C., Mévy, J.P. 2007. *Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species- Phytochemistry* . Vol. 68. p.840-852.
- Ourain, O., Agoumi, A., Alouik, et al. 2005. Approche thérapeutique de dermatophyties par les huiles essentielles de plantes aromatiques marocaines. *Pharmacologie*, 1 : p. 3-12.
- Pattnaik, S., Suberamanyam, V.R., Kole, C.1996. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. *Microbios*, 86 : p. 237-246.
- Peyron, L. 1992. Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques, chapitre 10, pp 217 – 238. Cité In : *Les arômes alimentaires*. Coordinateurs H. Richard et J.L Multon. Tec., Doc-Lavoisier et Apria Paris. p. 438.
- Pfohl-Leszkowicz, A. 1999. *Les mycotoxines dans l'alimentation, Evaluation et gestion du risque*. Lavoisier, collection Tec&Doc. 478 p.

- Pibiri, M.C. 2006. *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles*. thèse de doctorat : Lausan. Canada. p .177.
- Pierre, F. 2000. *Le grain de blé*. Paris : Quae. 313p.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M.J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A., Martinez-de-Oliveira J. 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55 : p. 1367–1373.
- PIP/COLEACP. 2011. *Fondement de la protection des cultures*. Bruxelles. Belgique. 293p.
- Pitt, J.I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br. Med. Bull*, 56 : p. 184 - 192.
- Pitt, J.I. 1988. *Laboratory guide to common Penicillium species*. Academia Press editor, London.
- Putievsky, E., Ravid, U., Snir, N., Sanderovich, D. 1984. The essential oils from cultivated bay laurel. *Israel Journal of Botany*. 33, p. 47-52.
- Quezel, P., Santa, S. 1962. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Ed C.N.R.S. Tome I. 565 p.
- Raper, K., Fennell, D.J. 1965. *The genus Aspergillus*”, Williams and Wilkins editors, Baltimore.
- Raviv, M., Putievsky, E., Senderovitch, D., Snir, N., Roni, R. 1983. Bay laurel as an ornamental plant. *Acta Horticulturea*. 132: p. 35-42.
- Reddy, M.V.B., Raghavan G.S.V., Kushalappa A.C., Paulitz T.C., 1996. Effect of microwave treatment on survival of *Fusarium graminearum* in wheat seed and seed quality. Symposium : *Lutte physique en phytoprotection*, 88e Assemblée annuelle de la Société de protection des plantes du Québec. 6-7 juin 1996. Québec.
- Robert, G. 2004. Huile essentielle de niaouli *Melaleuca quinquenervia* dans la prévention des radiodermites du cancer du sein. *Phytothérapie*, 3 : p. 72-76.
- Roger, C., Vincent, C., Coderre D., 1995. Mortality and predation efficiency of *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coccinellidae) following

- application of Neem extracts (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae). *J. Appl. Entomol*, 119 : p. 439-443.
- Royer, C. 1990. *Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plants*. 1^{ier} edition. Suisse PPUR. 287p.
 - Russo, M., Galletti, C., Bocchini, P et al. 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare ssp. hirtum* (Link)): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 46: p.3741-3746.
 - Sayoud, R., Ezzahiri, B., Bouznad, Z. 1999. *Les maladies des céréales et légumineuses en maghreb*. Alger : ITGC. 63p.
 - Sayyah, M., Valizadeh, J., Kamalinejad, M. 2002. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole. *Phytomedicine*, 9: p. 212-216.
 - Sefidkon, F., Bahmanzadegan, A., Assarech, M. 2008. Effet of distillation methods and harvesting times on the essentielle oil and cimeole contente of *Eucalyptus deabbeta*. *Chemistry of naturel compound*, 44: p 250-253.
 - Senhaji, O., Faid, M., Kalalou, L. 2006. Etude de pouvoir antifongique de l'huile essentielle de Cannelle. *Phytothérapie expérimentale*, 24 : p. 24-30.
 - Sharma, N.,Tripathi ,A. 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol Res*, 163: p. 337-344.
 - Silano, V., Delbò, M. 2008. *Assessment report on Foeniculum vulgare Miller*. EMEA. European Medicines Agency. London. 23p.
 - Silou, T. 2003. *Variations individuelle et saisonnière de la teneur et de la composition des huiles essentielles d'E. citriodora acclimaté à Pointe-Noire (Congo-Brazzaville)*. Université Marien Ngouabi. Faculté des sciences. p. 1-6.
 - Simon, J.E., Craker, L.E. 1984. Introduction to sweet basil cultivation. *Herb Spice Medical Plant Digest*, 2 : p. 6.
 - Smallfield, B. 2001. *Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purosos*. Crop & Food Resesearch. n. 45. 4p.

- Smid, E., Dewitte, Y., Gorris, L. 1995. Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. *Postharvest Biology and Technol*, 6: p. 303-312.
- Sokovic, M., Griensven, L.J.L.D.V. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom. *Agaricul bisporus. Europ. J. Plant Path*, 116: p.211–224.
- Stahl-biskup, E., Venskutonis, R. P. 2004. *Thyme. In: Handbook of herbs and spices* .Vol 2 (ed. Peters, K. V.). Boca Raton: CRC Press LLC, ISBN 0-8493-2535-8.
- Stefanini, M.B., Ming, L.C., Marques, M.O.M., Facanali, R., Meireles, M.A.A., Moura, L.S., Marchese, J.A., Sousa, L.A., 2006. Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). *Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu*, 8: p.193- 198.
- Stefanini, M.B., Ming, L.C., Marques, M.O.M., Meireles, M.A.A., Moura, L.S., Marchese, J. A. 2006. Seed productivity, yield and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* var. *dulcis* in the season of the year. *Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu*, 8 : p.86-90.
- Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., linhart, Y.B., Ehlers, B. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, 29: p. 859-880.
- Türkölmez, S et Soylu EM. 2014. Antifungal Efficacies of Plant Essential Oils and Main Constituents Against Soil-Borne Fungal Disease Agents of Bean. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, doi:10.1080/0972060X.2014.895160.
- Utree, A., Slump, R.A., Steging, G., Smid, E.J. 2002. Antimicrobial activity of carvacrol on rice. *Journal of food protection*, 63: p. 620-624.
- Valnet, M. 2005. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of food Microbiology*, 85: p.73-81.
- Vincent, C ; Panneton, B ; Fleurat-Lessard, F. 2000. La lutte physique en phytoprotection. INRA, Paris 2000 – ISSN : 1250-5218 – ISBN : 2-7380-0918-2.

- Vokou, D., Kokkini, S., Bressiere, J.M. 1988. *Origanum onites* (lamiaceae) in Greece Distribution, volatile oil yield, and composition .*Economy botanic*, 42: p .407-412.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian ,Y. 2008. Li X- Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106: p.804-810.
- Weinreich, K., Nitz, M .1996. Perfumer and flavorist. Vol. 25. n. 4. 55p.
- Wendakoon, K., saguchi, N.A. 1995. Methods of asses quality and stability of oils and fat-containing foods .AOCS.press, champaign.
- Zaid, N., Pierre, G. 2011. *Danger dans l'assiette*. Paris: Quae. 184p.
- Zeković, ZP; Lepojević, ZD; Mujić IO. 2009. Laurel Extracts Obtained by Steam Distillation, Supercritical Fluid and Solvent Extraction. *Journal of Natural Products*, 2: p.104-109.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Les CMF des huiles essentielles contre les sept champignons testés

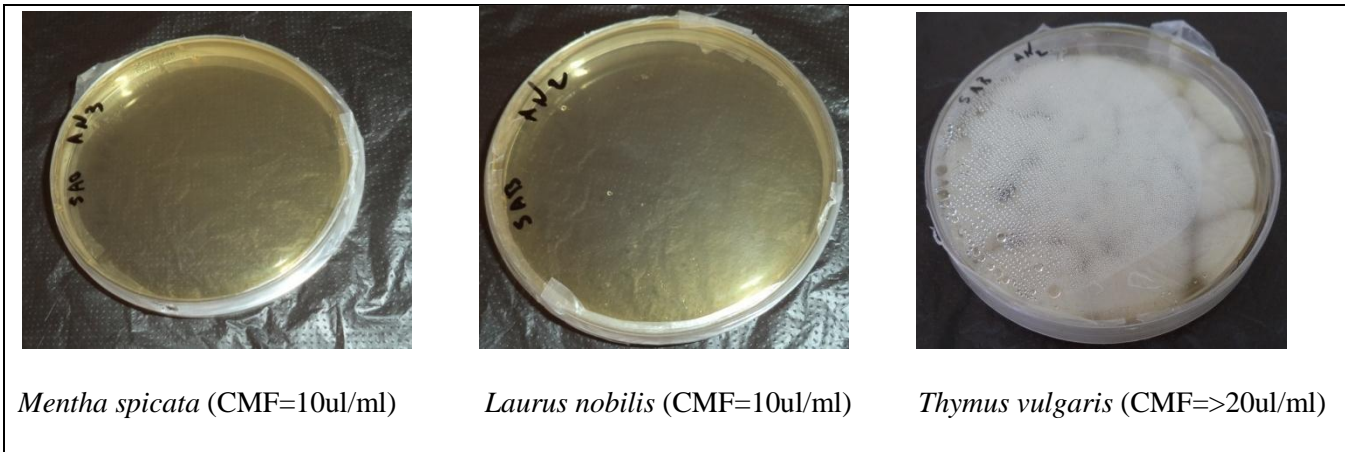


Photo 1 (originale) *Aspergillus niger*

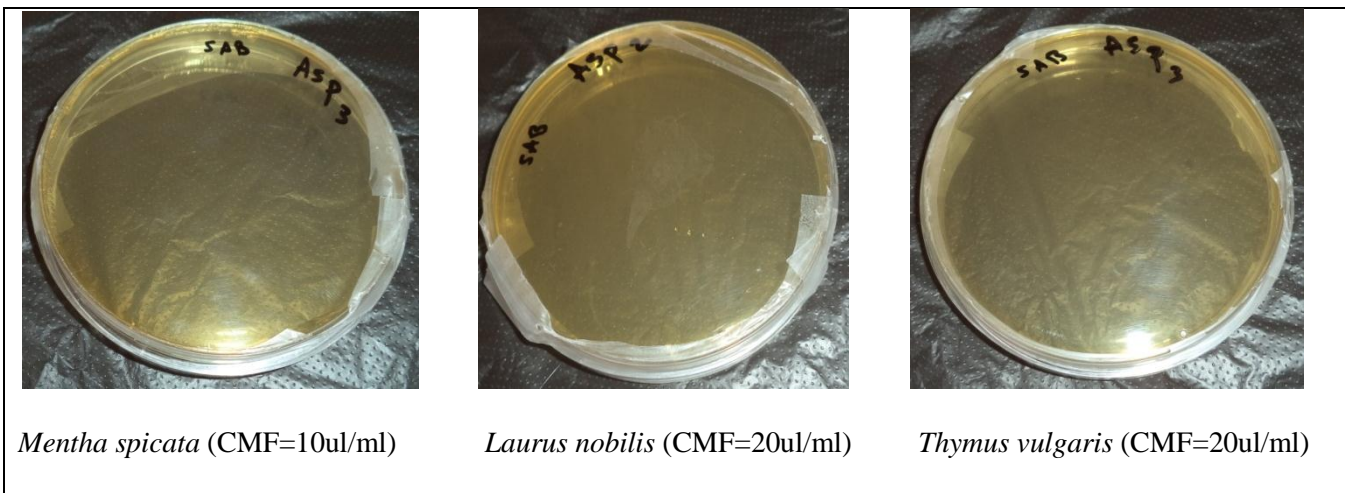


Photo 2 (originale) *Alternaria sp*

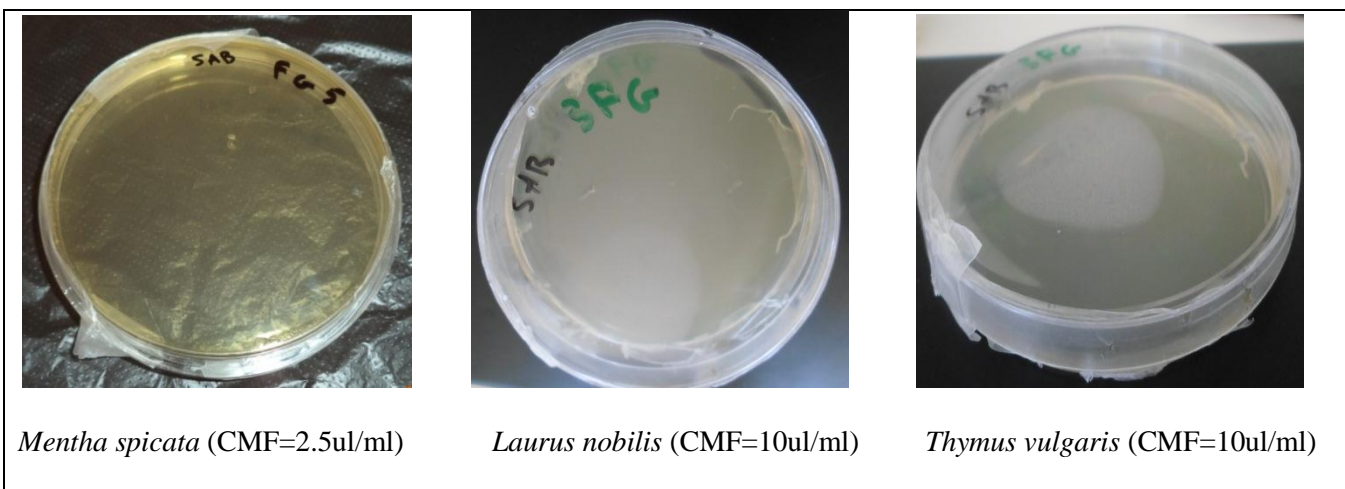


Photo 3 (originale) *Fusarium graminearum*

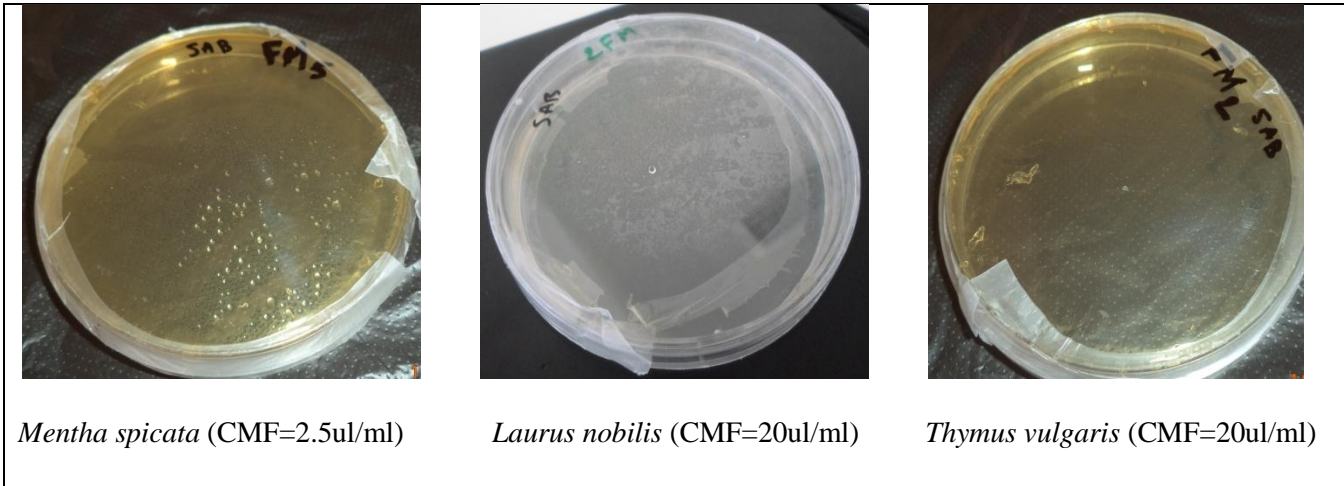


Photo 4 (originale) *Fusarium moniliforme*

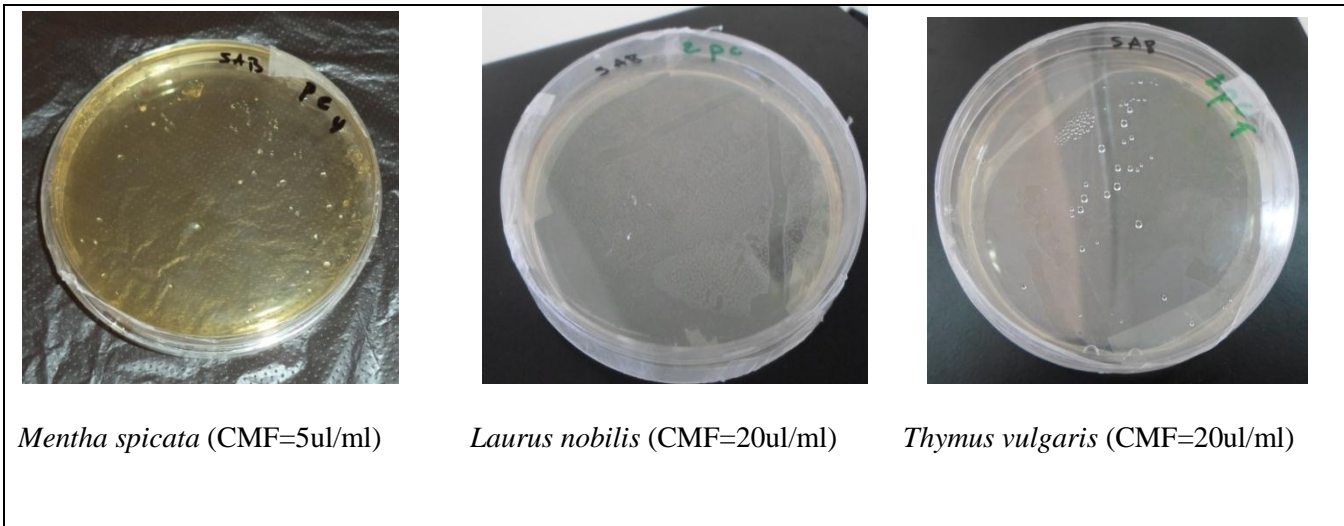


Photo 5 (originale) *Penicillium citrinum*

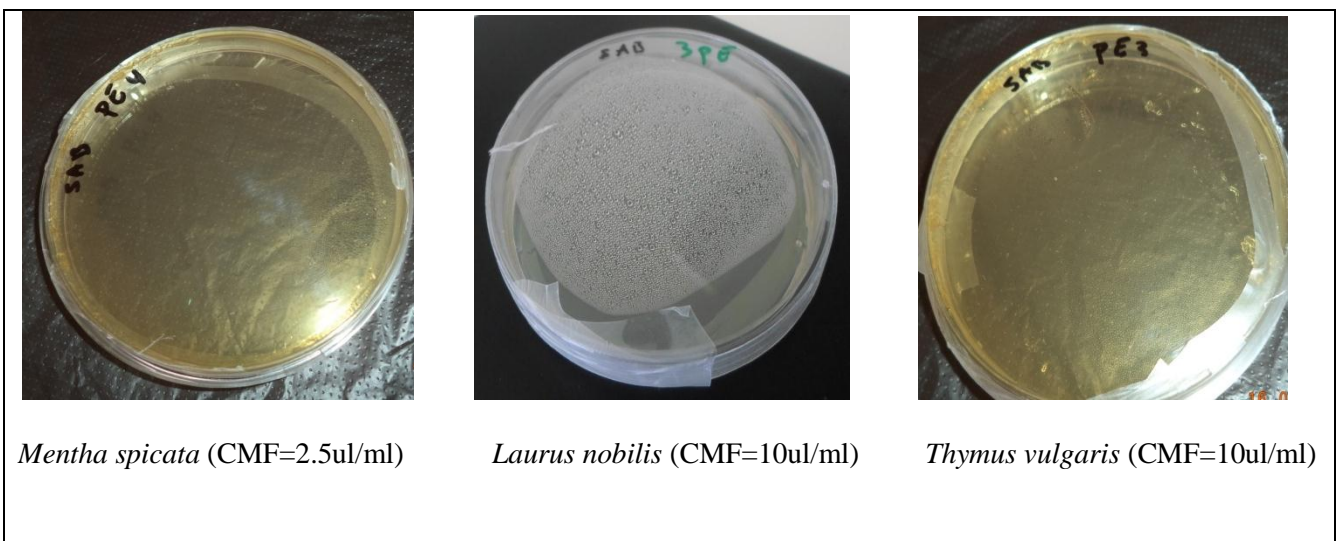


Photo 6 (originale) *Penicillium expansum*

ANNEXE N°2 : Les plages de la densité optique et la taille de l'inoculum pour les moisissures communes et rares

Species	OD Range (%T) ^a	10 ⁶ CFU/mL Range
<i>A. nidulans</i>	0.09–0.11 (80–82)	1.1–2
<i>A. flavus</i>	0.09–0.11 (80–82)	0.4–4
<i>A. fumigatus</i>	0.09–0.11 (80–82)	0.6–5
<i>A. terreus</i>	0.09–0.11 (80–82)	0.9–5
<i>Bipolaris hawaiiensis</i>	0.2–0.3	0.07–0.4
<i>B. spicifera</i>	0.2–0.3	0.3–3
<i>Cladophialophora bantiana</i>	0.15–0.17 (68–70)	0.4–3.1
<i>Dactylaria constricta</i>	0.15–0.17 (68–70)	0.4–1
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.15–0.17 (68–70)	0.8–5
<i>F. solani</i>	0.15–0.17 (68–70)	0.5–5.9
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0.09–0.13	0.8–2.3
<i>P. variotii</i>	0.09–0.11 (80–82)	ND
<i>Scedosporium apiospermum</i>	0.15–0.17	0.4–3.2
<i>R. arrhizus</i>	0.15–0.17	0.4–2.6
<i>S. prolificans</i>	0.15–0.17	0.6–1.7
<i>S. schenckii</i>	0.09–0.11	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0.09–0.11	0.7–2.3
<i>Wangiella dermatitidis</i>	0.15–0.17	1.2–3.7

^a %T = percent transmission.

Source : Espinel-Ingroff et Cantón, 2007

ANNEXE N°3 : Composition du milieu de culture RPMI-1640, Sigma R6504

Composé	g/L
L-Arginine [Free Base]	0.2
L-Asparagine [Anhydrous]	0.05
L-Aspartic Acid	0.02
L-Cystine·2HCl	0.0652
L-Glutamic Acid	0.02
L-Glutamine	0.3
Glycine	0.01
L-Histidine [Free Base]	0.015
Hydroxy-L-Proline	0.02
L-Isoleucine	0.05
L-Leucine	0.05
L-Lysine·HCl	0.04
L-Methionine	0.015
L-Phenylalanine	0.015
L-Proline	0.02
L-Serine	0.03
L-Threonine	0.02
L-Tryptophan	0.005
L-Tyrosine·2Na·2H ₂ O	0.02883
L-Valine	0.02
Biotin	0.0002
Choline Chloride	0.003
Folic Acid	0.001
myo-Inositol	0.035
Niacinamide	0.001
D-Pantothenic Acid Hemicalcium	0.00025
PABA	0.001
Pyridoxine·HCl	0.001
Riboflavin	0.0002
Thiamine·HCl	0.001
Vitamin B12	0.000005
Calcium Nitrate·4 H ₂ O	0.1
Magnesium Sulfate [Anhydrous]	0.04884
Potassium Chloride	0.4
Sodium Chloride	6.0
Sodium Phosphate Dibasic [Anhydrous]	0.8
D-Glucose	2.0
Glutathione, Reduced	0.001
Phenol Red·Na	0.0053

Préparation du RPMI 1640:

-10.4 g de poudre RPMI 1640,

-34.53 g de Tampon MOPS,

-1 L d'eau distillée,

-Ajuster le pH à 7.0

