

République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان  
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMEN  
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers  
Département Ecologie et Environnement



# MÉMOIRE

Présenté par

**Lachgueur Meriem**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

**En ECOLOGIE ANIMALE**

**Thème**

**Efficacité fongicide de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* sur la mycoflore de l'orange *Citrus sinensis***

Soutenu le ....., devant le jury composé de :

Présidente	Mme Kassemi Naima	MCB	Université de Tlemcen
Encadrante	Mme Gaouar Benyelles Nassira	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur	Mr Mestari Mohamed	MAA	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2020/2021**

## فعالية مبيد الفطريات من الزيت العطري الأمويدات منفيرتيسيلات على فطريات الحمضيات البرتقالي

## ملخص

هذا العمل هو جزء من مساهمة في الدراسة في المختبر وفي الجسم الحي للقوة المضادة للفطريات للزيت العطري للنبات الطبي (nounkha) الذخيرة العمودية على ميكوفلورا من البرتقال *Citrus Sinensis* ، وبشكل أكثر دقة على قالب *Penicillium italicum*، المسؤول عن تعفن أزرق ويسبب أضرارًا جسيمة.

قدم النبات قيد الدراسة عائد 2.33. تم إجراء تقييم النشاط المضاد للفطريات في EO في الجسم الحي ثم في المختبر بطريقتين ؛ التخفيف في الوسط السائل والانتشار على الأقراص ، من أجل تحديد مؤثر مضاد للفطريات ومنطقة التثبيط. أثبتت النتائج التي تم الحصول عليها فعاليتها في مبيدات الفطريات ، حتى في التركيزات المنخفضة. 50 ميكرو لتر للثقافة في الجسم الحي و 1 ميكرو لتر / مل لكل من طرق الاستزراع في المختبر. لذلك يمكننا أن نقدمه كعلاج طبيعي لمبيدات الفطريات ضد *Penicillium italicum* والعفن الأخضر الذي يسببه.

## الكلمات الدالة

زيت أساسي من الذخيرة العمودية ، مبيدات الفطريات ، *Penicillium italicum* ، الحمضيات الصينية

**Titre en français :Efficacité fongicide de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* sur la mycoflore de l'orange *Citrus sinensis***

**Résumé**

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à l'étude in vitro et in vivo du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de la plante médicinale *Ammoidesverticillata* (nounkha) sur la mycoflore de l'orange *Citrus Sinensis*, plus précisément sur la moisissure *Penicillium italicum*, responsable de la pourriture bleue et qui provoque des dégâts considérables.

La plante faisant l'objet de cette étude a fourni un rendement de 2.33. L'évaluation de l'activité antifongique de son HE a été réalisée in vivo puis in vitro par deux méthodes ; dilution en milieu liquide et diffusion sur disques, afin de déterminer l'indice antifongique et la zone d'inhibition. Les résultats obtenus ont prouvé son efficacité fongicide, même à de faibles concentrations ; 50µl pour la culture in vivo et 1 µl/ml pour les deux méthodes de culture in vitro. Nous pouvons donc la proposer comme traitement fongicide naturel contre *Penicillium italicum* et la pourriture verte qu'il provoque.

**Mots clés**

Huile essentielle, *Ammoides verticillata*, Fongicide, *Penicillium italicum*, *Citrus sinensis*.

**Title en english:****Fungicidal efficacy of the essential oil of *Ammoidesverticillata* on the mycoflora of the orange *Citrus sinensis*****Summary**

This work is part of a contribution to the in vitro and in vivo study of the antifungal power of the essential oil of the medicinal plant *Ammoidesverticillata* (nounkha) on the mycoflora of the orange *Citrus Sinensis*, more precisely on the mold *Penicillium italicum*, responsible for blue rot and which causes considerable damage.

The plant in this study provided a yield of 2.33. The evaluation of the antifungal activity of its HE was carried out in vivo and then in vitro by two methods; dilution in liquid medium and diffusion on discs, in order to determine the antifungal index and the zone of inhibition. The results obtained have proven its fungicidal efficacy, even at low concentrations; 50µl for in vivo culture and 1µl/ml for both in vitro culture methods. We can therefore propose it as a natural fungicide treatment against *Penicillium italicum* and blue rot that it provides.

**Mots clés :**

Essential oil, *Ammoidesverticillata*, Fungicide, *Penicillium italicum*, *Citrus sinensis*.



## Remerciements

Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide d'ALLAH qui m'a donné la force afin de l'accomplir.

En premier lieu, je tiens à adresser toute ma reconnaissance à mon encadreur **Mme Gaouar Benyelles Nassira**, Professeur au Département Ecologie et Environnement (Faculté SNV/STU) Université de Tlemcen, pour avoir accepté de diriger ce travail avec beaucoup de compétence.

Un grand merci à **Mme Senouci Hanane**, Docteur en Ecologie Animale, Faculté SNVSTU, Université de Tlemcen, d'avoir bien voulu co-encadrer ce travail et pour ses encouragements, son aide précieuse et sa gentillesse, elle s'est considérablement investie dans la réussite de ce mémoire et les résultats obtenus tiennent essentiellement à son accompagnement.

Mes plus vifs remerciements vont à **Madame Kassemi Naima**, Maître de Conférences au Département Ecologie et Environnement, Faculté SNVSTU, Université de Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury.

Un grand merci à **Monsieur Mestari Mohamed**, Maître-Assistant au Département Ecologie et Environnement, Faculté SNVSTU, Université de Tlemcen, d'avoir bien voulu juger ce travail.

Je remercie également **Mr Kebdani Mohamed** de m'avoir aidé et pour toutes les informations et les conseils qu'il m'a donné pendant que j'étais au laboratoire.



# Dédicaces

Je dédie ce travail

A ceux que j'aime du fond de mon cœur, à qui je dois la vie et qui n'ont cessé, à aucun moment, de me soutenir et de m'encourager par leurs prières et leurs sacrifices : *mes chers parents.*

A mes frères : **Mohamed, Zaki, Marouane et Taha**

A mon fiancé **Beddi Mohamed** pour tous les sacrifices qu'il a fait pour moi et ses encouragements envers moi.

A toute ma famille et mes Amis qui m'aiment et me souhaitent bonne chance dans ma vie.

**Meriem**

# Sommaire

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>01</b>
<b>CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. Les agrumes</b>	
1. Données générales sur les agrumes.....	03
2. Présentation générale de l'origine des agrumes.....	03
3. Classification .....	05
<b>II. Les orangers</b>	
1. Description.....	06
2. Classification.....	06
2. Différents types d'orangers.....	07
4. Quelques maladies qui affectent les orangers.....	08
1. Taches graisseuses.....	08
2. La moniliose.....	08
3. Les cochenilles et pucerons .....	08
4. <i>Penicillium digitatum</i> et <i>Penicillium italicum</i> .....	09
5. les insectes ravageurs .....	10
<b>III. La plante étudiée : <i>Ammoides verticillata</i>(Nounkha)</b>	
1. Généralités sur la plante.....	12
2. Répartition géographique.....	13
3. Description.....	13
4. Systématique .....	14
<b>IV. Les huiles essentielles</b>	
1. Définition d'une huile essentielle.....	15
2. Localisation.....	15
3. Propriétés et caractéristiques.....	16
4. Rôle des huiles essentielles.....	16
5. Principaux domaines d'utilisations.....	17
6. Principales méthodes d'extractions.....	17
6.1. Hydrodistillation.....	17
<b>V. Activité et lutte biologique</b>	
1. Définition.....	18
2. Activité biologique des HES.....	18
3. Activité antifongique.....	18
4. Tests in vivo/in vitro.....	18
<b>CHAPITRE II : Matériels et Méthodes</b>	
<b>1. Matériel végétal.....</b>	<b>20</b>
1.1. Choix de la plante.....	20
1.2. Provenance de la plante <i>Ammoides verticillata</i> .....	20
1.2.1. Situation géographique de la zone d'étude.....	20
1.2.2. Conservation de la plante(Nounkha.....	21
1.3. Extraction de l'huile essentielle de la plante (nounkha).....	22

1.3.1. Matériels utilisés.....	22
1.3.2. Méthodes.....	22
1.3.3. Conservation de l'extrait.....	22
1.3.4. Rendement.....	23
<b>2. Les activités antifongiques.....</b>	<b>24</b>
2.1. Matériels utilisés.....	24
2.2. Méthodes.....	24
2.2.1. Préparation du milieu de culture.....	24
2.2.2. Purification.....	25
2.2.3. Identification des moisissures à partir des oranges.....	25
2.2.4. Isolement de la souche fongique.....	26
2.2.5. Tests antifongiques.....	26
2.2.5.1. Culture in vivo.....	27
2.2.5.2. Culture in vitro.....	27
a. Méthode de dilution en milieu liquide.....	28
b. Méthode de diffusion sur disques.....	28
<b>CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>29</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>40</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>42</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Classification des agrumes.....	05
<b>Tableau 02</b> : Classification des orangers.....	07
<b>Tableau 03</b> : Classification et systématique de <i>Ammoidesverticillata</i> .....	14
<b>Tableau 04</b> : Situation géographique de Tlemcen ( <b>Encarta, 2009</b> ).....	17
<b>Tableau 05</b> : Différentes concentrations utilisées dans l'expérience.....	26
<b>Tableau 06</b> : Caractères organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Ammoidesverticillata</i> .....	30
<b>Tableau 07</b> : Rendement en H.E de <i>Ammoidesverticillata</i> par hydrodistillation.....	30
<b>Tableau 08</b> : Différents indices antifongiques obtenus par les concentrations auxquelles ils correspondent.....	35
<b>Tableau 09</b> : Différents diamètres des zones d'inhibition avec les taux d'inhibition auxquels ils correspondent.....	37

# Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Origine des formes cultivés (s'adaptée de Ollitrault <i>et al.</i> 2012).....	04
<b>Figure 02</b> : Aire de répartition d'origine des agrumes (Garcia-Loret <i>et al.</i> , 2013) .....	04
<b>Figure 03</b> : Arbre de l'oranger.....	06
<b>Figure 04</b> : <i>Citrus sinensis</i> (Orange douce).....	07
<b>Figure 05</b> : <i>P. digitatum</i> (pourriture verte) et <i>P. italicum</i> (pourriture bleue (Tabti, 2015)).....	10
<b>Figure 06</b> : la plante <i>Ammoides verticillata</i> (Nounkha).....	12
<b>Figure 07</b> : Quelques organes sécréteurs d'huiles essentielles (Tayoub <i>et al.</i> , 2006).....	15
<b>Figure 08</b> : Situation géographique de la région étudiée.....	21
<b>Figure 09</b> : <i>Ammoides verticillata</i> à l'état sec.....	21
<b>Figure 10</b> : Dispositif d'hydrodistillation.....	22
<b>Figure 11</b> :Flacon en verre teinté contenant de l'huile essentielle.....	23
<b>Figure 12</b> : Préparation du milieu de culture .....	24
<b>Figure 13</b> : Etapes de purification de la souche isolée.....	25
<b>Figure 14</b> : Tests antifongiques .....	26
<b>Figure 15</b> :Aspects macroscopique et microscopique de <i>Penicillium italicum</i> .....	31
<b>Figure 16</b> :Aspects macroscopique et microscopique de <i>Penicillium notatum</i> .....	32
<b>Figure 17</b> : Résultats des tests in vivo après 15 jours.....	33
<b>Figure 18</b> :Résultats obtenus par la méthode de dilution en milieu liquide après 7 jours.....	34
<b>Figure 19</b> : Histogramme des indices antifongiques obtenus par les différentes concentrations..	35
<b>Figure 20</b> : Résultats des tests in vitro par la méthode de diffusion sur disques.....	36
<b>Figure 21</b> :Représentation circulaire des différents taux d'inhibition obtenus par l' <i>Hesde Ammoides verticillata</i> .....	37

## Liste des abréviations

**A.V** : *Ammoides verticillata*

**ANSM** : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

**AFNOR**: Association Française de Normalisation

**HE** : Huile Essentielle

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**OILB**: Organisation Internationale de Lutte Biologique

**LB** : lutte Biologique

**SM**: Solution Mère

**CMI**: Concentration Minimale Inhibitrice

**Rd**: Rendement

**OMS**: Organisation Mondiale de la Santé

**ml**: millilitre

**µl** : MicroLitre

**PDA** : Potato Dextrose Agar

# **INTRODUCTION**

# INTRODUCTION

---

L'utilisation des plantes aromatiques par l'homme est une pratique antique (**Majinda et al., 2001**).

De nos jours la majorité des habitants du globe terrestre utilisent de très nombreuses plantes, tenant compte de leurs propriétés aromatiques comme assaisonnement ou comme remède en médecine traditionnelle (**Millago et al., 2005**). Les plantes aromatiques et médicinales connues par leurs propriétés biologiques intéressantes sont utilisées dans divers domaines à savoir en médecine, en pharmacie, en cosmétologie et en agriculture.

Actuellement, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plante, en tant que soins de santé primaire (**Krishnaiah et al., 2011; Bakchiche et al., 2013**).

L'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à pouvoir antimicrobien. Ainsi les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (**Bruneton, 1999; Teuscher et al., 2005**).

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums.

Les huiles essentielles ont suscité beaucoup d'intérêt scientifique au fait qu'elles présentent une source d'antioxydants naturels et de molécules biologiquement actives.

Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses (**Chalchat et al., 1997; Baser et al., 2001**) et pour la protection des aliments contre les altérations (**Miguel, 2010 ; Djenane et al., 2012**).

Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (**Cimanga, 2002**). Ainsi, les huiles essentielles et leurs composantes, actuellement employées comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires et insecticides (**Burt, 2004 ; Bakkali et al., 2008 ; Miguel, 2010**).

A cet effet et dans le cadre de la valorisation de quelques espèces aromatiques et médicinales, poussant à l'état spontané à Tlemcen ou encore pouvant y être introduites dans un objectif de développement durable, nous avons orienté notre travail sur l'étude des activités antifongiques de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*, une espèce qui appartient à la famille des Apiacées qui est caractérisée par sa forte action stimulante et son

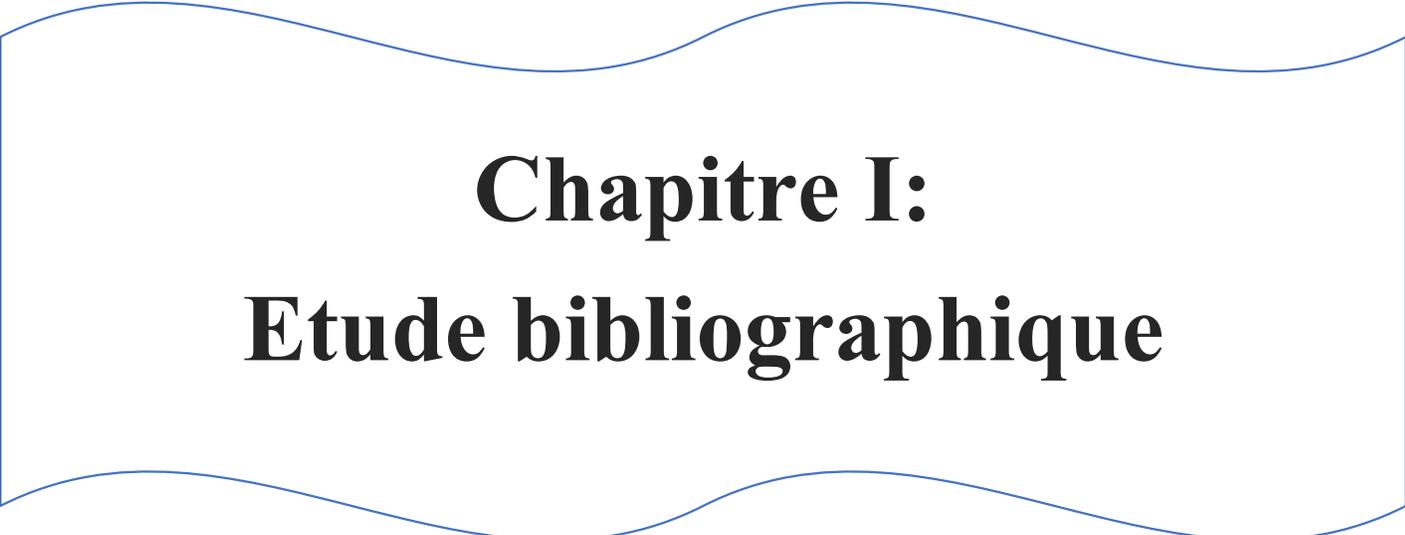
remarquable pouvoir et son activité antifongique sur le champignon du genre *Penicillium* qui attaque les orangers (**Abdelouahed et Bekhchi, 2004**).

Notre travail sera donc réparti en trois chapitres, initié par une étude bibliographique sur les huiles essentielles, les agrumes et plus précisément sur les orangers, les activités biologiques (antifongique), la plante *Ammoides verticillata* et le genre *Penicillium*.

Dans le deuxième chapitre, nous allons décrire les méthodes d'extraction de l'huile essentielle ainsi que les protocoles expérimentaux préconisés pour évaluer leurs activités antifongiques sur la souche fongique isolée et étudiée *Penicillium verticillata*.

Dans le troisième chapitre, nous annoncerons les résultats obtenus ainsi que leurs discussions.

Nous terminerons par une conclusion résumant les résultats de l'étude effectuée.



**Chapitre I:**  
**Etude bibliographique**

## I. LES AGRUMES

### 1. Données générales sur les agrumes

Le mot agrume provient du latin *acrumen* qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides (**Bachés et Bachés, 2011**).

Les agrumes sont de petits arbres ou arbustes de taille moyenne, cultivés dans l'ensemble des régions tempérées chaudes, tropicales et subtropicales. Ils étaient traditionnellement cultivés dans les jardins avec d'autres espèces telles que la noix de coco, les fruits à pain, la papaye et autres, à cause de leur fruits (oranges douces, mandarines, pamplemousses, etc.) et pour leur valeur médicinale.

### 2. Présentation générale de l'origine des agrumes

Ils sont d'origine indienne, appartiennent à la famille des *Rutaceae* et se décomposent en trois genres principalement cultivés : *Fortunella*, *Poncirus* et *Citrus* (**Swingle, 1943**).

Initialement, le genre *Citrus* s'est structuré autour de 4 taxons originaires d'Asie de l'est : le cédratier (*Citrus medica* L.), le pamplemoussier (*Citrus maxima*), le mandarinier (*Citrus reticulata* Blanco) et *Citrus micrantha* Wester, un proche parent de la lime *Citrus aurantifolia* (**figure 1**) (**Swingle, 1943**). La découverte de la variété *Citrus micrantha*, originaire des Philippines, est très récente. Il y a encore quelques années, nous nous basions sur 3 taxons de base dans l'évolution des agrumes, sans connaître précisément l'origine de la lime (**figure 2**)

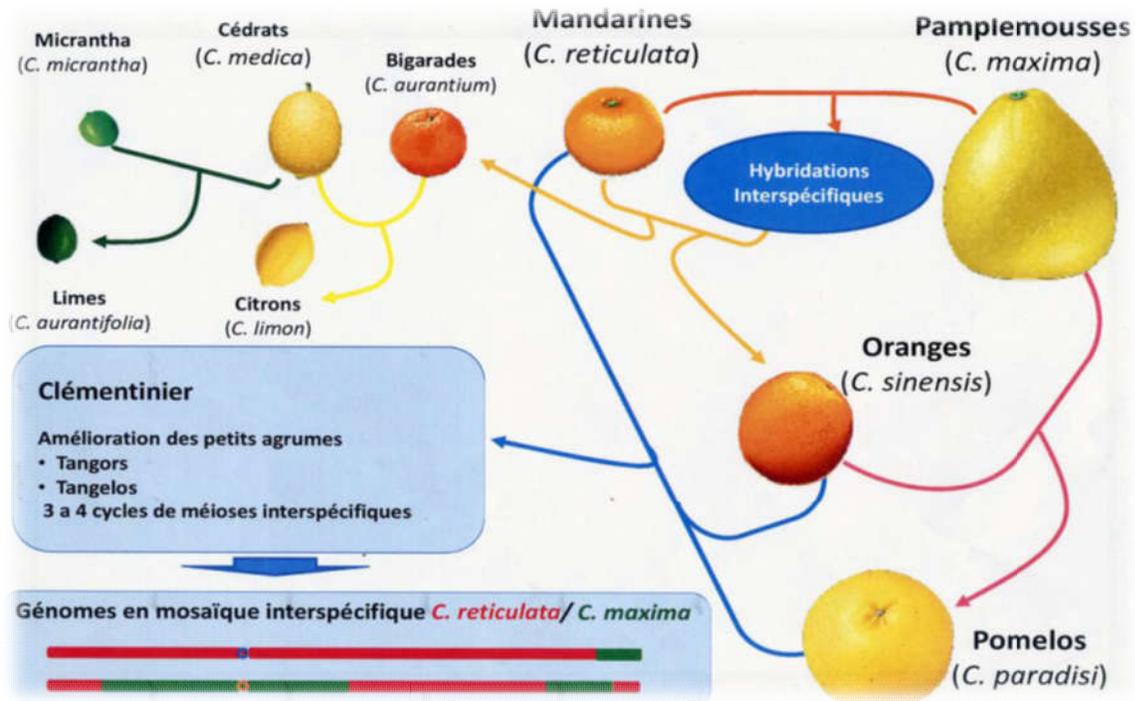


Figure 01 : Origine des formes cultivés (Ollitrault et al., 2012)

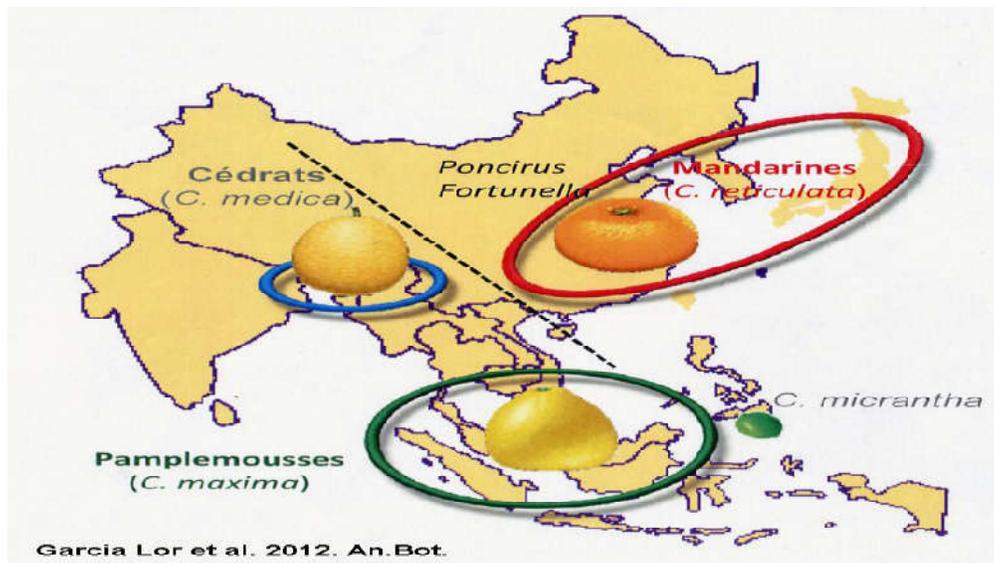


Figure 02 : Aire de répartition d'origine des agrumes (Garcia-Loret et al., 2012)

### 3. Classification

Au fur à mesure de l'histoire et des mouvements humains, ces quatre groupes de base auraient donné lieu à des recombinaisons génétiques par hybridation, créant ainsi les autres types d'agrumes que l'on peut rencontrer aujourd'hui : bigaradiers, citronniers pamplemoussier, mandarinier et oranger (**figure2**) (**Nicolas, 2013**).

Selon (**Guignard, 2001**), la classification des agrumes se présente comme suit :

**Tableau 01 : Classification des agrumes**

<b>Embranchement</b>	spermaphytes
<b>Sous-Embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Eudicotylédones
<b>Sous-classe</b>	Rosidés
<b>Ordre</b>	Rutales
<b>Famille</b>	Rustaceae
<b>Genres</b>	Poncirus, Fortunella et Citrus

## II. LES ORANGERS

### 1. Description

L'oranger est un arbuste sempervirent de taille moyenne de 12 mètres de hauteur, avec un tronc unique au bois dur et une écorce mince et lisse, des branches épineuses et des feuilles de 4 à 10 cm de long (*figure 3*). Il est originaire de l'Asie du Sud-est, soit de l'Inde, soit du Viêtnam ou du sud de la Chine (Harley et al., 2006).



Figure 03 : Arbre de l'oranger

### 2. Classification

L'oranger *Citrus sinensis* L. est une espèce de la famille des Rutacées ; cultivé dans les régions chaudes comme les pays méditerranéens, cet hybride ancien est probablement un croisement entre le pamplemousse et la mandarine. Ses fruits sucrés et comestibles sont les oranges.

D'après (Swingle, 1943) La position taxonomique des oranges se présente comme indiqué dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Classification de l'oranger

<b>Régne</b>	Plantae	<b>Ordre</b>	sapindales
<b>Classe</b>	Magnoliopsida	<b>Famille</b>	Rosaceae
<b>Sous-classe</b>	Magnoliidae	<b>Genre</b>	<i>Citrus</i>
<b>Super ordre</b>	Rosanae	<b>Espèce</b>	<i>sinensis</i>

### 3. Différents types d'orangers

La classification horticole des orangers se fait sur la base de différents caractères, choix arbitraires et par conséquent discutables, ce qui permet de classer les orangers en trois groupes :

- ❖ Les blonds
- ❖ Les oranges de saison
- ❖ Les navels

Une mutation unique en 1820, dans l'oranger d'un monastère au Brésil, a donné naissance à l'orange navel qui est aussi connue sous le nom de Navel Washington (*figure 4*).

Ce groupe se différencie des autres par deux caractéristiques bien distinctes :

- présence au sein de l'apex d'un petit fruit rudimentaire appelé Navel ;
- l'aspermie très fréquente du fait de la non viabilité de la plupart des ovules et de l'absence de pollen fonctionnel. Ils sont aussi remarquables par leur précocité et leur excellente qualité gustative (**Kebdani, 2017**).



**Figure 04** : *Citrus sinensis* (Orange douce)

#### 4. Quelques maladies qui affectent les orangers

L'oranger fait partie des agrumes les plus atteints par des maladies graves qui ne sont malheureusement pas visibles immédiatement.

##### 4.1. Tâches graisseuses

Cette maladie touche les régions chaudes et humides, elle est provoquée par le champignon *Mycosphaerella citri*. Il se caractérise par une fine croûte noire, ressemblant à de la suie. Les feuilles sont atteintes en surface seulement, il est lié à la présence de pucerons et cochenilles, qui avec leurs sécrétions collantes qui sont notamment vecteurs de la fumagine, favorisent le développement de la maladie (Manner et al., 2005).

##### 4.2. La moniliose

Le champignon attaque les fruits qui finissent par pourrir, une tache brun clair apparaît d'abord sur une partie des fruits puis sur l'ensemble, qui va se ramollir. Cette maladie se manifeste généralement au printemps.

##### 4.3. Les cochenilles et pucerons

- a. **Tristeza** : est un virus à l'origine de maladies graves de l'orange, fréquentes sur les cultures en intérieur, les cochenilles peuvent également envahir le feuillage des orangers, ce qui provoque une croissance retardée, des tiges trouées, des feuilles abimées et des fruits jaunes avec une taille réduite (Manzanero, 2004).
- b. **Psorose** : est une maladie qui se rencontre sous diverses formes ayant généralement des symptômes corticaux très différents, mais des symptômes foliaires assez proches (INRA de Rabat, 1968).

Ces parasites forment un amas blanchâtre et collant dispersé sur l'ensemble des feuilles pour y faire face éviter l'excès d'humidité, c'est une maladie virale.

#### 4.4. *Penicillium italicum* et *Penicillium digitatum*

- a. *Penicillium italicum* est responsable de " la pourriture bleue " des agrumes, ainsi nommée à cause de la couleur de ses spores, C'est un parasite des épidermes intacts, plus redoutable de ce fait que *P. digitatum*.

Ses spores sont présentes tout au long de la chaîne, de l'emballage à la consommation. L'épiderme atteint s'éclaircit, devient mou, puis un duvet mycélien blanc apparaît, qui se couvre rapidement de spores bleues (*figure 05*).

Les spores sont facilement transportées d'un fruit à l'autre et la pourriture se propage aussi directement par contact.

Aux températures basses d'entrepôt, son activité est supérieure à celle de *P. digitatum*, Les deux espèces peuvent cohabiter sur un même fruit, *P. italicum* venant parfois se surimposer à *P. digitatum*, mais jamais l'inverse.

La chair est simultanément contaminée et le fruit, même partiellement atteint, devient inconsommable.

*Penicillium digitatum* est responsable de " la pourriture verte " des agrumes, ainsi nommée à cause de la couleur de ses spores qui, en fin d'évolution, couvrent la totalité des fruits atteints. C'est un parasite de blessures, ne pouvant pénétrer les épidermes intacts.

Les possibilités de contamination au verger existent, mais l'essentiel des infections survient à la récolte, à l'emballage et dans les étapes suivantes de la commercialisation et de la consommation.

Ces deux *Penicillium* sont responsables de plus de 80 % des pourritures des agrumes (*figure 05*), toutes les espèces et variétés y sont sensibles. Ces champignons existent dans le monde entier. Ils sont présents en permanence, tout au long de la chaîne, depuis le verger jusqu'aux réfrigérateurs domestiques, en passant par les stations d'emballage, les véhicules de transports, les entrepôts, les magasins de demi-gros et les détails.

Aussi sont systématiquement associées, mais leurs biologies diffèrent par leurs modes d'infection et par les symptômes qu'elles provoquent (**Mazih et al., 2007**).



**Figure 05 :** *P. digitatum* (pourriture verte) et *P. italicum* (pourriture bleue) (Tabti, 2015)

## 5. Les insectes ravageurs

Ils constituent le groupe le plus important par le nombre d'espèces que par le volume des dommages causés. Ces insectes sont très variés. Tous les organes de la plante peuvent être attaqués (Praloran, 1971).

### 5.1. Les cochenilles (Coccines) et les aleurodes (Aleurodes)

Ce groupe s'alimente des feuilles, racines et fruits de l'oranger, dont elles percent les cellules des plantes avec leurs rostrés piqueurs (Lecrant, 1970).

Parmi ces nombreux parasites, on cite : le pou rouge de Californie *Aonidiella aurantii*, qui s'attaque aux brindilles, aux feuilles et aux fruits ; la cochenille tortue *Saissetia* sp. ; La cochenille farineuse *Planococcus citri* ; la mouche blanche *Dialeurodes citri* ; la mouche noire *Aleurocanthus woglumi* et la mouche blanche laineuse *Aleurothyrixus floccosus* (Praloran, 1971).

### 5.2. Les aphides (Aphidés), les psylles et les thrips (thysanoptères) :

Beaucoup d'espèces d'aphides affectent les agrumes avec leur capacité à transmettre des agents pathogènes. La plus répandue, le puceron noir de l'oranger *Toxoptera citricida*, est le vecteur du Tristeza. Le psylle asiatique de l'oranger *Diuraphis citri* est le vecteur de la

bactérie responsable de citrus greening, ainsi que le thrips à ailes blanches *Homalodiscacoagulata*(Selka, 2007).

### 5.3. Les mouches des fruits

Les mouches des fruits (Diptera, Tephritidae) d'importance économique sont dans une grande proportion des espèces polyphages, dont le nombre de plantes hôtes varie d'une dizaine à une plusieurs centaines (Cayoletal., 2003).

Parmi les mouches des fruits, la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* et la mouche asiatique des fruits *Bactroceradorsalis* représentent une source de dégâts directs sur de nombreuses espèces et variétés d'agrumes (Quilici, 2003).

### III. *Ammoïdesverticillata* (Nounkha)

#### 1. Généralités sur la plante

Les plantes avec leur nombre illimité constituent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels, grâce à leurs molécules qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structure chimique et activités biologiques (Madi, 2010).



Figure 06 : *Ammoïdesverticillata* (Nounkha)

*Ammoïdes verticillata* est une plante odorante, caractérisée par ses fleurs blanches, ses graines riches en essence et forte odeur aromatique, caractéristique du thymol qui ont un goût qui rappelle beaucoup celui du thym, on la trouve généralement dans les champs, les pelouses, les montagnes et dans les forêts (Quezel et Santa, 1963).

Cependant, les principaux pays cultivateurs sont l'Egypte, l'Iran et surtout l'Inde (Quezel et Santa, 1963 ; Baytop et Sfitlipinar, 1986 ; Khajeh et al., 2004). Son appellation dans notre pays est Nounkha ou Nûnkha, tirée du nom Perse «Nankhah» qui est utilisée en Iran, comme aromate dans le pain. En effet, «Nan» et «Khah » signifient respectivement pain et goût (Baytop et Sfitlipinar, 1986).

En Algérie, cette plante jouit d'une grande faveur populaire. En effet, elle est particulièrement utilisée dans la préparation de la soupe d'escargot et comme tisane (**Kambouche et al., 2003**).

La plante *Ammoïdes verticillata* est largement utilisée pour prévenir et guérir diverses maladies. Un nombre élevé de propriétés médicinales et thérapeutiques des différentes parties de la plante a été décrit. Elle est surtout utilisée pour soigner les problèmes respiratoires, rhume, fièvre, migraine, troubles gastriques, infections rénales etc... Ainsi, les graines de la plante montrent plusieurs effets thérapeutiques à savoir : diurétique, analgésique, carminatif, anti-diarrhéiques, antihistaminique, vermifuge, ...et antiasthmatique (**Felidj et al., 2010**)

## 2. Répartition géographique

*Ammoïdesverticillata* (Nounkhah) est une plante spontanée qui pousse en Afrique du Nord, en Ethiopie et en Turquie. Elle s'étend également en région méditerranéenne. Elle est cultivée en Inde, en Iran, au Pakistan, en Afghanistan et en Egypte. Les graines mures une fois récoltées sont séchées et battues.

D'après **Quezel et Santa (1963)**, c'est une plante médicinale répandue dans toute l'Algérie, poussant dans les champs, les pelouses et les forêts.

## 3. Description

*Ammoïdes verticillata* est une plante annuelle ou bisannuelle, avec des feuilles radicales pennatifides qui possèdent 3 à 5 segments rapprochés, elle a des tiges peu ramifiées ou dressées, leurs fruits sont ovoïdes de moins de 1mm de long (**Quezel et Santa, 1963**).

## 4. Systématique

C'est la classification des êtres vivants d'après un système fondé sur l'emploi d'un seul ou d'un petit nombre de caractères génétiques, morphologique et embryologiques. La composition chimique est devenue un caractère taxonomique supplémentaire (**Lawrence, 1980**).

*Ammoïde(ou ptychotis) verticillata* est classé selon la clé de détermination botanique, d'après **Quezel et Santa (1963)** et **Guinochet et Vilmorin (1975)** et **Benoît Bock & al (2017)** comme suit :

**Tableau 03** : Classification et systématique de *Ammoïdes verticillata*

<b>Embranchement</b>	Phanérogames ou spermaphytes
<b>Sous- embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Eudicotylédones
<b>Sous- classe</b>	Dialypétales
<b>Ordre</b>	Apiales
<b>Famille</b>	Apiacées
<b>Genre</b>	<i>Ammoïdes</i>
<b>Espèce</b>	<i>Ammoïdes verticillata</i>

## IV. LES HUILES ESSENTIELLES

### 1. Définition d'une huile essentielle HE

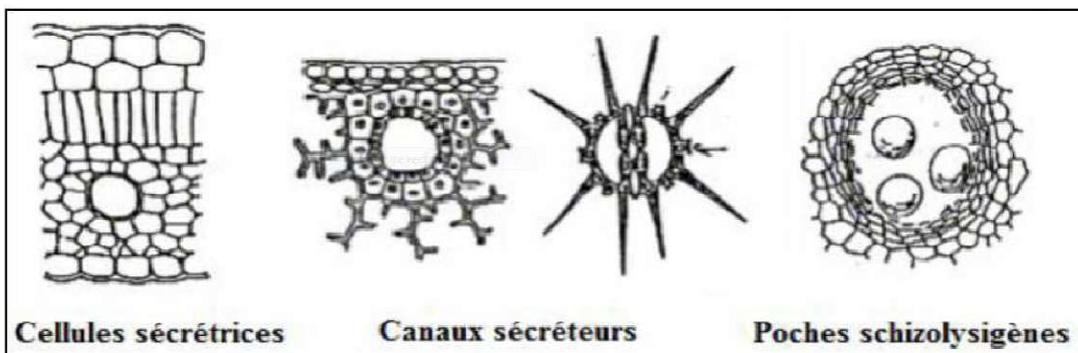
Le terme « huile essentielle » HE est défini à la fois par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) pour les usages pharmaceutiques et cosmétiques et par l'AFNOR/ISO pour les usages aromatiques et alimentaires. Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances (molécules) variées, aromatiques (odorantes) et très volatiles, produites et obtenues à partir d'une matière première (plante) et présentes sous forme de minuscules gouttelettes, Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

Généralement ce sont des antiseptiques antibactériens, vermifuges ou stomachiques.

### 2. Localisation

Les HE sont stockées dans tous les organes de la plante ; par exemple : dans les sommités fleuries (menthe, lavande), les feuilles (eucalyptus, laurier), les rhizomes (gingembre), les fruits (agrumes, badiane, anis), les racines (vétiver), les graines (muscades), bien que cela soit moins habituel dans des écorces (cannelier) (**Yahyaoui, 2005**).

Elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules ou se rassemblent sous forme de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles (**Bouamer et al., 2004**).



**Figure 07** : Quelques organes sécréteurs d'huiles essentielles (**Tayoub et al., 2006**)

### 3. Propriétés et caractéristiques

- ✓ Les HEs sont obtenues par expression (réservée aux agrumes) ou par distillation à la vapeur d'eau, Une huile végétale est obtenue par pression, et est constituée majoritairement de corps gras (**Binet et Brunel, 2000**)
- ✓ La teneur des plantes en huile essentielle est faible de l'ordre de 1 à 3 % à l'exception du clou de girofle de (14 à 19 %), du macis (10 à 13 %), de la noix de muscade (8 à 9 %), de la cardamome (4 à 10 %).
- ✓ leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C.
- ✓ leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0,75 à 0,99 (les huiles essentielles de girofle et de cannelle constituent des exceptions).
- ✓ elles ont un indice de réfraction élevé.
- ✓ elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels.
- ✓ ce sont de parfums et ont une conservation limitée.
- ✓ elles sont très altérables et sensibles à l'oxydation (mais ne rancissent pas).

Ce sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, très odorantes et volatiles à température ambiante, elles sont généralement liquides (**Bruneton, 1999**).

### 4. Rôle des Huiles Essentielles

Le rôle biologique des HEs dans l'écologie est évident ; ce sont des messagers chimiques, utilisés par les plantes aromatiques pour interagir avec leur environnement, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante reste inconnu (**Rai et al., 2003**).

Elles permettent d'éloigner les maladies, les parasites, c'est un moyen de défense chez la plante. Elles protègent les cultures en inhibant la multiplication des bactéries et des champignons, mais aussi jouent un rôle protecteur face aux rayonnements du soleil, ainsi que dans la reproduction et la dispersion des espèces végétales puisqu'elles permettent d'attirer les insectes pollinisateurs par leur odeur (**Guignard, 2000**)

Elles peuvent paralyser les muscles masticateurs des agresseurs par les propriétés toxiques et inappétentes des substances qu'elles contiennent (**Capo et al., 2001**).

## 5. Principaux domaines d'utilisation

Elles sont utilisées dans certains médicaments, en parfumerie, en phytothérapie ou comme agents de saveur dans l'alimentation. On les retrouve de plus en plus en tant qu'arômes alimentaires comme exhausteur de goûts (café, thé, tabac, vins, yaourts, plats cuisinés,...) **(Sallé, 1991)**. La cosmétique et principalement la cosmétique-bio est également un secteur qui utilise de plus en plus d'huiles essentielles, on les retrouve dans de nombreux produits comme les savons, shampoings, gel-douches, crèmes, etc...**(Seu-saberno et Blakeway, 1984)** Les HEs servent par exemple comme produits phytosanitaires pour combattre dans les cultures végétales les infections fongiques, bactériennes et/ou virales. Elles apportent des solutions en agriculture biologique, réduisant les effets néfastes des pesticides de synthèse comme la pollution ou le développement de résistances **(Benouali, 2016)**.

## 6. Principales méthodes d'extraction

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les huiles essentielles. Les principales sont basées sur l'entraînement à la vapeur, l'expression, la solubilité et la volatilité. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction **(Samate Abdoul, 2001)**.

Il existe plusieurs méthodes de distillation dont voici les principales: L'entraînement à la vapeur d'eau, la distillation à vapeur saturée, l'hydrodiffusion, l'expression à froid et l'hydrodistillation **(Bruneton, 1993)**, **(Brian, 1995)**, **(Roux, 2008)**.

Au cours de ce travail, j'ai adopté la méthode d'hydrodistillation.

### 6.1. L'hydrodistillation

Le principe de l'hydrodistillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un

composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. (Brian, 1995)(fig.13).

## V. Activité biologique et lutte

### 1. Définition

L'organisation internationale de lutte biologique (OILB) définit la lutte biologique (LB) en 1971 par : « l'utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou les dommages causés par les organismes nuisibles ».

Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités fongicide, insecticide, herbicide, bactéricide, ...etc.

### 2. Activité biologique des HEs

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à l'intégralité de ses constituants et pas seulement à ses composés majoritaires.

Les HEs sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, antioxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (Lahlou, 2004).

### 3. Activité antifongique

Les infections fongiques sont très fréquentes dans notre société. Cette extension est largement favorisée par la prescription de manière abusive des antibiotiques, issus en premier lieu de champignons microscopiques. Les groupes de molécules aromatiques citées comme antibactériens sont également actifs sur les champignons.

Par exemple :

- *Candida albicans* est sensible aux HE d'origan, de cannelle de Ceylan, de thym vulgaire à thymol.

- *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* (onychomycoses « pied d'athlète ») est sensible aux HE de sarriette et d'arbre à thé.

#### **4. Tests *In vivo*/*In vitro***

**a. *In vivo***=au sein du vivant, est une expression latine qualifiant des recherches ou des examens pratiqués sur un organisme vivant.

**b. *In vitro***=dans le verre, est une expression aussi latine signifie un test en tube, en boîte plus généralement, en dehors de l'organisme vivant ou de la cellule.

# **Chapitre II**

## **Matériels & Méthodes**

## 1. Matériel végétal

### 1.1. Choix de la plante

La plante étudiée *Ammoides verticillata* a été choisie essentiellement sur la base de leur intérêt et leur fréquence d'emploi dans notre pays.

### 1.2. Provenance de la plante *Ammoides verticillata*

#### 1.2.1. Situation géographique de la zone d'étude

L'échantillon utilisé est d'origine commerciale(herboriste) provient de Tlemcen et dont les paramètres géographiques de cette région sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau04** : Situation géographique de Tlemcen(Encarta, 2009)

Station	Tlemcen
Latitude	34°53' Nord
Longitude	1° 19' Ouest
Altitude	800 m
Superficie	9061 cm <sup>2</sup>
Zone climatique	Modéré et semi-aride



**Figure 08** : situation géographique de la région étudiée(<https://www.google.com/maps>)

### 1.2.2. Conservation de la plante (Nounkha)

Nous avons ramené la plante au laboratoire alors qu'elle était en état de sécheresse là où nous l'avons fait divers traitements (nettoyage, cassage des tiges).

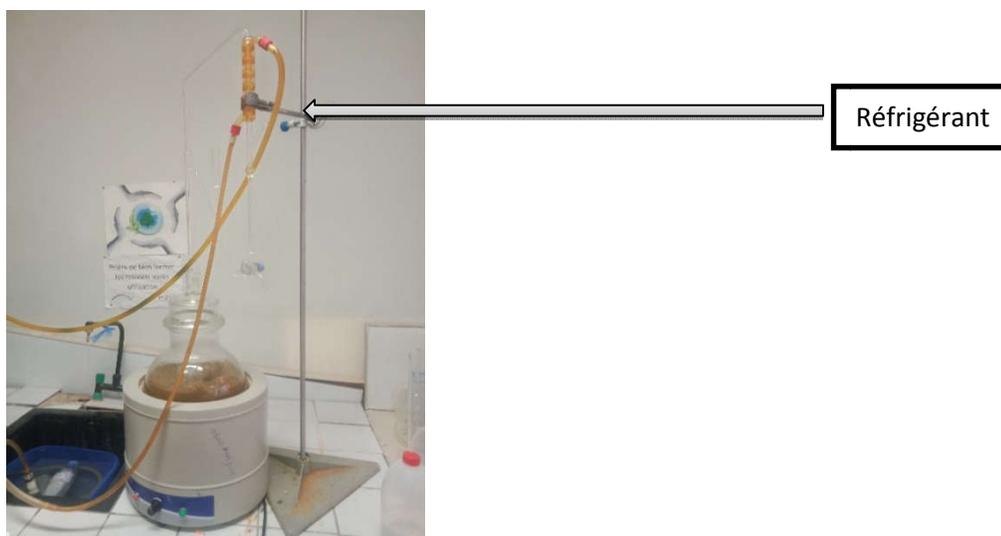


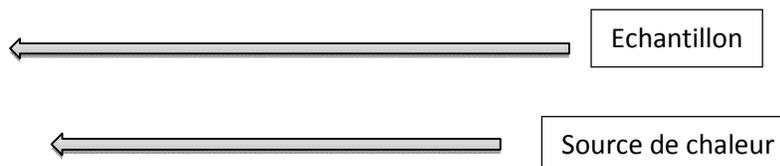
**Figure 09** : *Ammoides verticillata* à l'état sec

### 1.3. Extraction de l'huile essentielle de la plante (nounkha)

#### 1.3.1. Matériel utilisé

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger(**Clevenger,1928**).





**Figure 10** :Dispositif d'hydrodistillation

### 1.3.2. Méthodes

Nous avons immergé 250g de la biomasse végétale de *Ammoides verticillata* dans un alambic rempli d'eau distillée, que nous avons porté ensuite à ébullition pendant une durée de 2 à 3 heures ; La vapeur d'eau et l'essence libérées par le matériel végétal forment un mélange non miscible (*figure 10*).

### 1.3.3. Conservation de l'extrait

Très volatiles par nature, les HEs peuvent rapidement perdre leurs propriétés. Très vite, elles commencent à vieillir, généralement au bout de 6 mois. Au mieux, elles peuvent conserver leurs propriétés thérapeutiques pendant environ trois ans (**Lardry et Haberkorn, 2007**).

Pour cela, elles doivent être impérativement gardées à l'abri de l'air, de la lumière et de la chaleur et contenues dans des flacons en verre opaques ou teintés (en bleu ou brun), stériles et bien fermés, conservés au réfrigérateur à une température comprise entre 4 et 6°C jusqu'à leur utilisation pour différentes manipulations (**Werner, 2002; Telphon, 2003 ; Abrassart, 1997**).

Les HEs se volatilisent au contact de l'air. Aussi faut-il bien veiller à ne pas laisser les flacons trop longtemps ouverts (**Werner, 2002 ;Valnet, 1987**).



**Figure 11** :flacon en verre teinté contenant de l'huile essentielle

#### 1.3.4. Rendement (Rd)

Le rendement des huiles essentielles est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse sèche du matériel végétal à traiter (Carré, 1953 *In* Bekhchi, 2002).

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rd} = (\text{m1}/\text{m2}) * 100$$

Avec :

**Rd** : rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage ;

**m1** : masse en gramme d'huile essentielle ;

**m2** : masse en gramme de la matière végétal sèche (Carré, 1953 *In* Bekhchi, 2002).

## 2. Activités antifongiques

Nous avons isolé plusieurs souches de moisissures à partir des oranges prélevées mais nous avons choisi d'étudier celle qui cause les dégats les plus importants : *Penicillium italicum*, responsable de la pourriture bleue qui détruit 40 à 60% des oranges en post-récolte.

### 2.1. Matériels utilisés

- huile essentielle de *Ammoides verticillata*
- eau distillée
- solution DMSO
- PDA (Potato Dextrose Agar)

- Vortex
- Micropipette, Bêcher, boites de Pétri, boites en plastiques, anse de platine, pipettes Pasteur, tubes à essai, une pince, pipette gradué (tout est stérile).

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture a été préparé par solubilisation de 39g de PDA (EUR pharm.) dans 1 litre d'eau distillée (*fig.12*).



**Figure 12** : Préparation du milieu de culture

### 2.2.2. Purification

A partir d'une orange contaminée, nous avons procédé à la purification d'une souche de moisissure en appliquant plusieurs repiquages successifs sur milieu PDA, jusqu'à l'obtention d'un isolat à l'état pur (**fig13**).



**Figure 13 :** Etapes de purification de la souche isolée

### 2.2.3. Identification des moisissures isolées à partir des oranges

L'identification est une étude corrélative entre les caractères cultureux macroscopiques et les caractères microscopiques.

-les caractères cultureux : leur étude se fait à l'œil nu et à la loupe binoculaire. Ils se basent essentiellement sur l'aspect morphologique des colonies, la texture du thalle, la couleur du revers de la boîte de Pétri et la pigmentation des spores ainsi que l'odeur et la vitesse de croissance,

-les caractères microscopiques sont observés grâce à deux méthodes : soit par la méthode de microculture, soit par la méthode de scotch qui est la plus facile.

La technique de microculture, décrite par **Harris** en **1989**, consiste à inoculer les spores des moisissures sur des lames munies de petits carrés de PDA solidifiés et les couvrir par des lamelles.

### 2.2.4. Isolement de la souche fongique

Au cours de notre travail, nous avons adopté la méthode de **scotch** dont les étapes se présentent comme suit :

1-sur une lame de verre, déposer 1 goutte de bleu de Méthylène ;

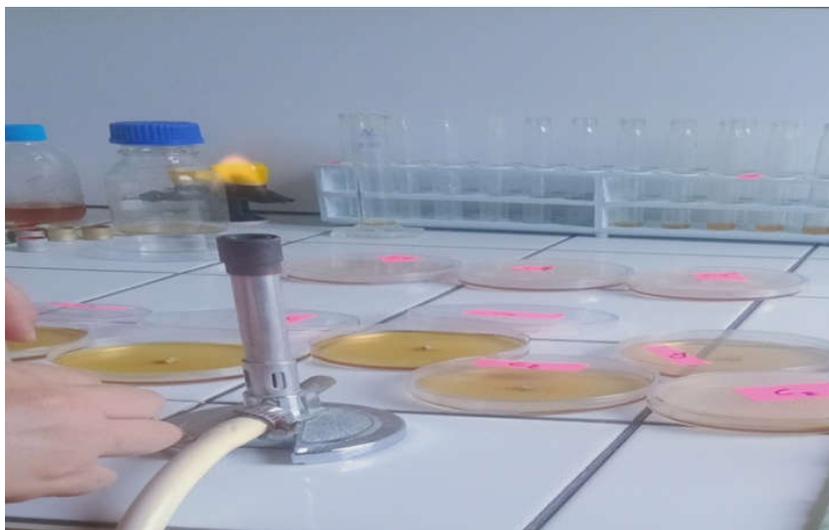
2-prélever, à l'aide d'un morceau de scotch transparent, le mucor directement dans la boîte de pétrie ;

3-coller ce morceau de scotch directement sur la lame ;

4-observer au microscope à l'objectif x40 (observation finale x400).

### 2.2.5. Tests antifongiques

Ces tests ont été réalisés au niveau du laboratoire d'Ecologie et Environnement afin de savoir si notre huile essentielle parvient à inhiber la croissance du champignon isolé à partir de nos oranges, *Penicillium italicum*.



**Figure 14:**Tests antifongiques

#### 2.2.5.1.Culture in vivo

Nous avons testé l'activité de l'extrait de l'HE sur des oranges, nous les avons placées dans 4 boîtes en plastique.

Trois boîtes contenant des oranges contaminées par le champignon et traitées par l'HE avec des concentrations successives (50µl, 30µl, 10µl) par exposition sur un morceau de papier filtre.

La troisième boîte contenait l'orange contaminée par le champignon et non traitée par l'HE comme témoin.

#### 2.2.5.2. Culture in vitro

L'activité antifongique de l'extrait a été déterminée par deux méthodes différentes, afin de mesurer le pourcentage de la zone d'inhibition et de déterminer l'indice antifongique.

##### a. La méthode de dilution en milieu liquide

Une solution mère SM a été préparée par le mélange de 50µl de l'extrait avec 50µl de DMSO ensuite des dilutions ont été réalisées pour obtenir des concentrations finales (**Tableau05**).

Nous avons mélangé la SM avec le milieu de culture (PDA) :

- Mettre 15ml de PDA dans les quatre tubes à essais ;
- ajouter successivement les différentes concentrations de la SM dans les tubes ;
- passer chaque tube au vortex pour homogénéiser et vider dans les boîtes de pétri ;
- exposer les disques de champignon dans le milieu de chaque boîte ;
- isoler deux boîtes contenant le champignon sans traiter par l'extrait comme témoins ;
- effectuer trois répétitions pour chaque tube.

L'incubation s'est faite à l'étuve à 37°C pendant 3 à 4 jours.

**Tableau05** : Différentes concentrations utilisées dans l'expérience

Numéro de Tube	Concentrations proposées (µl/ml)	Concentrations finales	
		S.M (µl)	PDA (ml)
1	0.1	1.5	15
2	0.3	4.5	15
3	0.8	12	15
4	1	15	15

### b. La méthode de diffusion sur disque

La méthode des disques est l'une des plus vieilles approches d'évaluation de la sensibilité du champignon aux HEs et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine (**Harley et Coll., 2010**).

Le principe de la technique est relativement simple, elle est basée sur le principe suivant :

- Un disque de papier buvard imprégné d'une concentration donnée de l'HE est déposé à la surface d'un milieu de culture spécifique (PDA) coulée en boîte de Pétri, uniformémentensemencée d'une suspension de champignon étudié, il s'humidifie et l'HE diffuse lentement dans le PDA, résultant en une zone d'inhibition autour du disque.

Les diamètres des zones d'inhibition permettent d'apprécier la sensibilité des germes. La lecture des résultats est rapportée par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions en (mm). Les zones doivent être uniformément circulaires (**Richard et Coll., 2007**).

Les résultats obtenus sont exposés dans le chapitre suivant.





**Chapitre III**  
**Resultats & Discussion**

### III-RESULTATS ET DISCUSSION

L'impact des moisissures sur la qualité des oranges étant de plus en plus préoccupant, le besoin de mieux les connaître conduit à élaborer des méthodes permettant de déterminer la nature des microorganismes présents et de proposer des moyens biologiques et naturels pour mieux les combattre, en évitant au maximum l'utilisation des pesticides dont on connaît la nocivité sur la santé et l'environnement.

Nous avons trouvé une biodiversité fongique importante qui a révélé, après les analyses effectuées sur les prélèvements, différents genres dont *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*; *Penicillium italicum* et *Penicillium notatum*.

Nous avons choisi d'en étudier particulièrement le plus pathogène, à savoir *Penicillium italicum*, responsable de la pourriture bleue des oranges, ne pouvant pas le faire pour toutes les espèces isolées, en raison du temps qui nous est imparti.

Nous avons testé l'efficacité fongicide de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* in vivo et in vitro tant pour la protection que pour la conservation des oranges.

Les résultats obtenus sont exposés dans ce présent chapitre.

#### 1. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle extraite

L'examen organoleptique de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* consiste en un essai olfactif ; toutefois, il est nécessaire de décrire l'aspect de cette huile et de sa saveur (Abbes, 2014; Hachemi et Hamzi, 2018).

**Tableau 06** : Caractères organoleptiques de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*

<b>Couleur</b>	Jaune clair
<b>Aspect</b>	Liquide
<b>Odeur</b>	Aromatique
<b>Saveur</b>	Fortement piquante

## 2. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est présenté dans le **tableau 07**, il est calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante.

**Tableau 07** : Rendement en H.E de *Ammoides verticillata* par hydrodistillation

Poids végétal(g)	Poids d'H.E(g)	Rendement en H.E(%)
250	5.831	2.33%

L'extraction de notre échantillon de *Ammoides verticillata* ou nounkha, effectué par hydrodistillation, a fourni un rendement de **2.33%**.

Généralement le rendement des huiles essentielles est différent d'une famille botanique à une autre, d'une espèce à une autre, cette différence de teneur en HE peut être liée à plusieurs facteurs tels que:

- La zone géographique de collecte;
- Le climat ;
- Le moment de la collecte et la méthode d'extraction (**Besombes, 2008**).

D'après **El Ouariachi et al. (2011)** ; l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation de la partie aérienne de *Ammoides verticillata* récoltées à partir de Ahfir (Maroc) donne des rendements de 2%.

Dans la même région (Oujda), **Benouham et al;(2012)** ont trouvé un rendement similaire à celui trouvé par nous, de l'ordre de 2.53, mais qui est sensiblement inférieur à celui de la même plante récolté par **El Ouariachi et al. (2011)**.

Dans le même contexte, les travaux de **Bekhechi et al. (2010)** sur la même plante, récoltée dans les régions de Tlemcen et de Ain-Temouchent, rapportent des rendements d'extraction en HE qui varient de 2.1 à 5.4%.

Donc notre résultat concorde avec ceux de la littérature, effectués dans notre région.

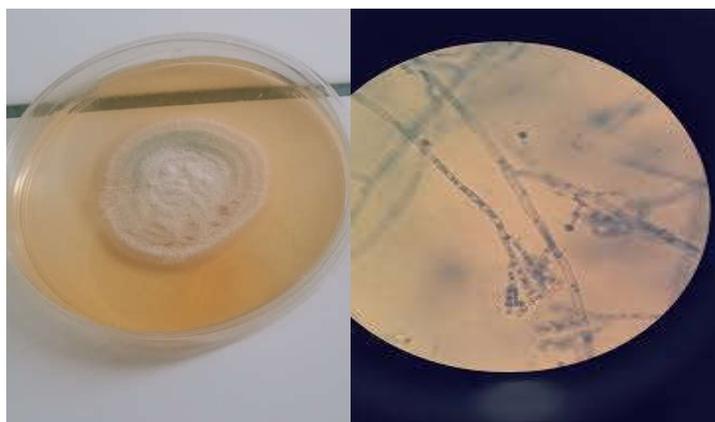
### 3. Activités antifongiques de l'Huile Essentielle

#### 3.1. Identification de la souche fongique

Le matériel fongique a été représenté par deux isolats de *penicillium* : *Penicillium italicum* et *Penicillium notatum*.



**Figure 15:** Aspects macroscopique et microscopique de *Penicillium italicum*



**Figure 16:** Aspects macroscopique et microscopique de *Penicillium notatum*

Les *Penicillium* sont des champignons très connus dans l'environnement pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils sont l'un des agents les plus communs de la détérioration des fruits et des légumes.

Par exemple, *P. italicum* et *P. notatum* sont des agents communs de la pourriture des agrumes, alors que le *P. expansum* est reconnu pour faire pourrir les pommes.

*P. italicum* et *P. notatum* sont des genres de champignons filamenteux de type moisissures appartenant au phylum des Ascomycètes qui se développent sur les fruits, en particulier les agrumes.

### 3.2. Culture in vivo

Les résultats de l'activité antifongique in vivo de l'HE de *Ammodendron verticillata* contre la croissance du champignon *Penicillium italicum* sont présentés dans la **figure 17**.



**Figure17:** Résultats des tests in vivo après 15 jours d'exposition

Selon les tests effectués, l'huile essentielle Hes a montré une activité antifongique intéressante contre *Penicillium italicum*, même au bout de 15 jours d'exposition.

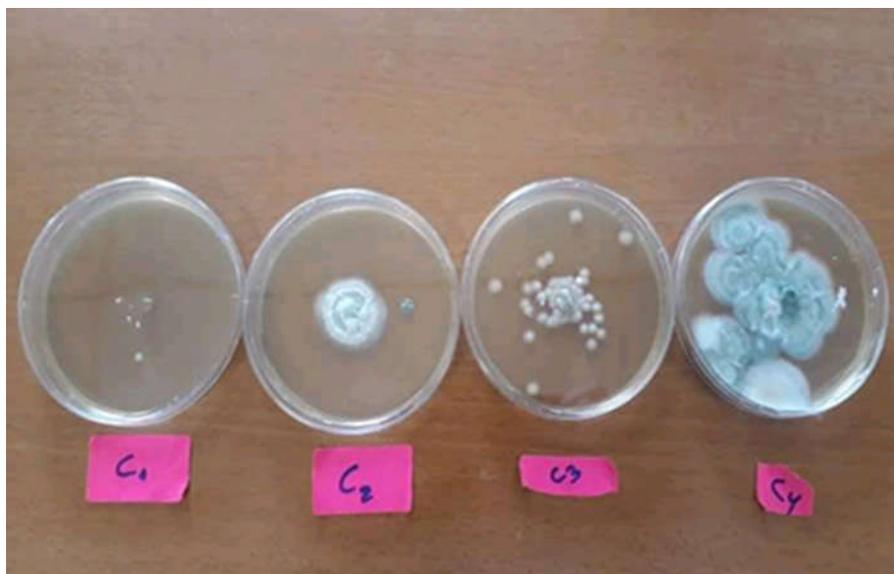
Nous avons remarqué que plus la concentration en huile essentielle est élevée, plus la croissance du champignon *Penicillium italicum* est faible.

Par rapport au témoin n'ayant subi aucun traitement et exposé aux mêmes conditions de température et pendant la même durée, nous avons relevé une croissance importante du champignon (figure 17).

### 3.3. Culture In vitro

#### 3.3.1. Méthode de dilution en milieu liquide

Les résultats obtenus à partir de cette méthode, après un suivi de sept jours sont indiqués dans la figure 18.



**Figure 18:** Résultats obtenus par la méthode de dilution en milieu liquide après 7 jours.

Après un suivi de sept jours, nous avons remarqué qu'il y avait une activité antifongique contre *Penicillium italicum* pour les quatre concentrations, mais la plus grande activité est marquée dans la boîte avec la Concentration  $C_1$  de 1  $\mu\text{l/ml}$  où il y avait une absence de croissance fongique.

### 3.1.1.1. Indice antifongique(IA)

Nous avons calculé cet indice par la formule :

$$\text{IA} = (\text{Da} - \text{Db}) / \text{Da} \times 100$$

Avec :

**IA** : Indice antifongique en (%) ;

**Da** : le diamètre de la zone de croissance du témoin;

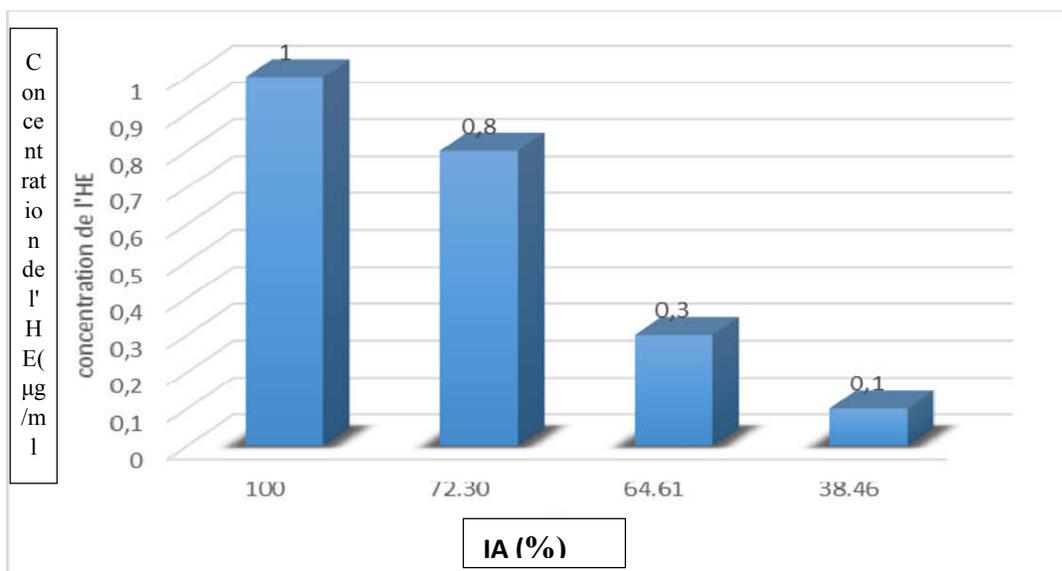
**Db** : le diamètre de la zone de croissance de l'essai ;

Les résultats en pourcentage sont présentés dans le tableau 08 suivant :

**Tableau 08:** Différents indices antifongiques obtenus par les concentrations auxquelles ils correspondent

Concentration de l'HE ( $\mu\text{l/ml}$ )	Diamètre du témoin (cm)	Diamètre de l'essai (cm)	IA(%)
C1=1	6.5	6.5	100 %
C2=0.8	6.5	1.8	72.30%
C3=0.3	6.5	2.3	64.61%
C4=0.1	6.5	4	38.46%

D'après nos résultats, nous remarquons que toutes les concentrations de l'huile essentielle de *Ammoides Verticillata* appliquées, ont empêché partiellement (aux concentrations de de 0.1  $\mu\text{l}$  à 0.8  $\mu\text{l}$ ) et complètement (à 1  $\mu\text{l}$ ), la croissance de la souche fongique testée *Penicillium italicum* (fig.1).



**Figure 19:** Histogramme des indices antifongiques obtenus par les différentes concentrations

L'indice antifongique est directement proportionnel à l'augmentation de la

concentration de l'HEs, il est stable à la concentration 1 avec un pourcentage d'inhibition de 100% ; une diminution remarquable de l'IA aux concentrations de 0.3 à 0.1 µl/ml avec un pourcentage d'inhibition de 64.61% jusqu'à 38.46 %.

## 2.Méthode de diffusion sur disques

La méthode de diffusion sur disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* vis-à-vis de la souche fongique isolée, *Penicillium italicum* (fig.20).

Les zones d'inhibition sont indiquées dans la figure suivante:



**Figure 20** : Résultats des tests in vitro par la méthode de diffusion sur disques

Nous avons remarqué une importante zone d'inhibition remarquable dans la boîte de la concentration C1=1 µl.

La croissance antifongique a été estimée quotidiennement après 48h en calculant la moyenne des deux diamètres mesurés sur les deux axes perpendiculaires tracés au revers des boîtes de culture en tenant compte de la croissance de témoin.

Le pourcentage d'inhibition I (%) a été déterminé par rapport au témoin et calculé selon la formule suivante:

$$I(\%) = [1 - (Da / Db)] \times 100$$

Avec:

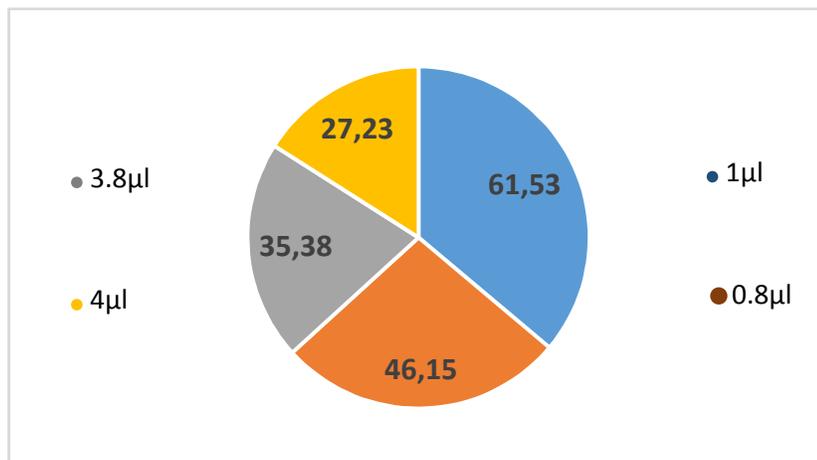
**I (%) :** taux d'inhibition exprimé en pourcentage ;

**Da:** croissance fongique moyenne dans le milieu en présence de l'huile ;

**Db:** croissance fongique moyenne dans le milieu sans huile (témoin)(**Tableau09**).

**Tableau09:** Différents diamètres des zones d'inhibition avec les taux d'inhibition auxquels ils correspondent

Concentration( $\mu\text{l/ml}$ )	Diamètre de la zone d'inhibition(mm)	La zone d'inhibition(%)
C1=1	4	61.53%
C2=0.8	3	46.15%
C3=0.3	2.3	35.38%
C4=0.1	1.87	27.23%



**Figure 21:** Représentation circulaire des différents taux d'inhibition obtenus par l' *Hesde Ammoides verticillata*

L'huile essentielle est dite :

- **Très active** lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 75 et 100 % ; la souche fongique est dite très **sensible** ;
- **Active** lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 50 et 75 % ; la souche fongique est dite **sensible** ;
- **Moyennement active** lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 25 et 50 % ; la souche fongique est dite **limitée** ;
- **Peu ou pas active** lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 0 et 25 % ; la souche fongique est dite **peu sensible** ou **résistante**;

Donc on peut dire que notre huile est active à **1µl** de concentration et la souche fongique *Penicillium italicum* est **sensible** à cette huile.

## Discussion générale

L'étude de la sensibilité des champignons par la culture in vivo et les deux méthodes de culture in vitro, celle de dilution en milieu liquide et celle de diffusion sur disques, a clairement montré des différences entre les deux méthodes d'essai appliquées quoique les résultats soient similaires.

Nous avons constaté que les deux méthodes adoptées au cours de ce travail nous ont permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* vis-à-vis de la souche fongique *Penicillium italicum*.

Nos résultats indiquent que l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* a montré une bonne activité antifongique, donc nous avons répondu au problème posé au début de cette mémoire, à savoir comment protéger et conserver de manière biologique, sans traitement fongicide de synthèse très nocif, les oranges atteintes par la pourriture bleue due au champignon *Penicillium italicum* qui pose un grand problème aux agriculteurs, notamment en post-récolte.

Il vaut donc la peine de l'utiliser comme alternative aux pesticides pour éviter et réduire les dommages qu'ils occasionnent au sol, aux plantes et à toute l'agriculture, ce qui nuit à notre santé et à l'environnement.



# **CONCLUSION**

## CONCLUSION

---

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a suscité un grand intérêt dans la recherche biomédicale, elle trouve de nombreuses applications dans divers domaines tels qu'en médecine, pharmacie et agriculture.

Les HE extraites de certaines plantes aromatiques ont prouvé, à ce même titre, leur valeur inestimable pour la santé. Il faut garder à l'esprit que les HE, comme l'ensemble des plantes médicinales, ont un rôle de médicament, que leurs actions thérapeutiques sont souvent puissantes et nécessitent qu'elles soient utilisées de manière appropriée. Beaucoup de scientifiques, dans le monde entier ont effectué des recherches sur les HE pour leur trouver des activités pharmacologiques, cosmétologiques et biologiques fort intéressantes.

Connaissant le nombre de plantes riches en HE et leur diversité, il est tout à fait recommandable de continuer les travaux dans ce domaine. L'apparition des souches fongiques résistantes aux traitements chimiques à base de fongicides synthétiques pousse à la recherche d'alternatives plus efficaces et plus sûres et surtout naturelles, protégeant la santé et l'environnement, ainsi que la biodiversité.

Dans ce cadre, notre travail a été consacré à l'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle HE de *Ammoides verticillata* contre l'un des champignons des plus pathogènes des oranges, *Penicillium italicum*, qui leur provoque une pourriture bleue, détruisant ainsi 40 à 60% des récoltes.

Face au problème d'altération des orangers par ces moisissures, beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antifongique des produits naturels extraits de plantes.

Lors de cette étude, l'activité antifongique de L' HE vis-à-vis la souche fongique isolée a été effectuée, *in vivo et in vitro*, par deux méthodes différentes, celle de dilution en milieu liquide et celle de diffusion sur disques, qui ont prouvé toutes les deux l'efficacité fongicide de l'HE testée.

A la lumière des résultats obtenus par l'étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*, on constate que cette plante testée possède une activité très importante avec un volume d'huile pure de **50µl** pour la culture *in vivo* et **1 µl/ml** avec dilution avec le DMSO pour les deux méthodes de culture *in vitro*.

## CONCLUSION

---

Ainsi, ce travail a contribué aux travaux qui ont précédé sur ce sujet, mais il n'en demeure pas moins que cette étude doit être reconduite sur plusieurs années afin de confirmer la grande efficacité de cette huile contre les champignons pathogènes en la testant sur d'autres espèces qui posent problème aux agrumiculteurs.

# **Références bibliographiques**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### -A-

- Abdelouahed D.A. et Bekhechi C., 2004 .** Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles d'*Ammoïdes Verticillata (Nounkha)* : *Rev, biologie et santé* 4(2) :1-10.
- Abrassart J.L.** Aromathérapie essentielle : huiles essentielles : parfums pour le corps et l'âme. Éditions Guy Trédaniel.1997, 271 pages.
- Abbes A.,2014.**Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoïdes verticillata* (Nounkha) de la region de Tlemcen. Mémoire de fin d'etude ,Université de Tlemcen,p:44.

### -B-

- Bachès B. et Bachès M (2011).** Agrumes, nouvelle. Edition ULMER: 7127. **Baytop T. et Sultupinar N. (1998)** .Characteristics of « Nanhan » cultivated in Anatolia an dits volatile oil. J. Fac. Pharm. Istanbul, 22 :73-76.
- Belzile C., Morillon R., Navarro L., Brunel D., et Talon M., 2012.** SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the Citrus genus(Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. BMC Genomics. 19p. Article de recherche.
- Benouali.D,(2016)-** Extraction et identification des huiles essentielles ,oran 04p.
- Benoît Bock & al., (2017).** Nomenclature de la flore de la France. Rev Tela Botanica version 4.01 du « 15 mars 2017 ».
- Binet P. et, Brunel J. P. (2000)** - Physiologie Végétale. Tome II. Edit., Doin. p54
- Bouamer A .Bellaghit M.et Mollay Amera. (2004)** -Etude comparative entre l'huile essentielle de la menthe verte et la menthe poivrée de la région de Ouargla ; Mémoire DES Unive. Ouargla, p 2-5 ; 10 ; 19 ; 21-22.
- Bruneton J., 1999a** — Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 3ième édition. Ed. Tec et Doc., pp. 484 - 535.
- Bruneton J., 1999b** — Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales& Paris, Lavoisier,585p.
- Bruneton j.(1993)** : pharmacognosie phytochimie,plantes médicinales.2ème éd Tec.Doc,Lavoisier,Paris,France.
- Bakchiche B., Gherib A., Aazza S., Gago C., Miguel M.G. (2013).** Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, 46: 85-96.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Baser K.H., Tümen G., Tabanca N. , Demirci F. (2001).** Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Satureja wiedemanniana* (Lallem.). *Velen. Z. Naturforsch*, 56c: 731-738.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008).** Biological effects of the essential oils. *Food and chemical toxicology* 46: 446-475.
- Burt S. A.( 2004 ).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International J offoodMicrobiology*, 94: 223 – 253 .
- Brian M.L.(1995) :**The isolation of aromatic materials from plant products,R.J.Reynolds Tobacco Company,Winston-Salem(USA),p.57-148.
- Besombes C,(2004).**Contribution à l'etude de phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. THése Doctorat.Université de Rochelle p:41-45.
- Bekhechi C. (2012).** Analyse de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (Nûnkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. *Mémoire de Magister*, option Biologie Moléculaire et Cellulaire, université Abou Bakr Belkaïd.
- Bnouham M., Benalla W., Asehraou A. & Berrabah M. (2012).** Antibacterial activity of essential oil from *Ptychotis verticillata*. *Spatula*, 2(1): 69-73.
- C-**
- Capo M., Courilleau V., et Valette C. (1990) -** Chimie des couleurs et des odeurs. Culture et techniques, 204 p.
- Chalchat J.K., Carry L.P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. & Chopineau J.(1997).** Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, 9: 67-75.
- Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totte J., Pieters L. & Vlietinck A.J. (2002).** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol.*, 79(2): 213-320.
- Carré P.(1953):**précis de technologie et de chimie industrielle Tome 3,Ed Vallière J.B et fils France,Paris **In :Bekhchi C.(2002) :**analyse d'huile essentielle d'*Ammoïdes Verticillata* (nounkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoirantimicrobien Thése de magister,Université de Tlemcen.
- Clevenger J.F.(1928) :**Les substances de réserve du pin marine :role éventuel des métabolites secondaires.*Actuel.Bot.*,1.25-40.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### -D-

**-Djenane D., Aïder M., Yangüela J., Idir L., Gómez D. & Roncalés P. (2012).** Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science*, 92: 667-674.

### -E-

**-El Ouariachi E., Tomi P., Bouyanzer A., Hammouti B., Desjobert J –M., Costa J., Paolini J. (2011) :** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Rev, Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 533–536.

### -F-

**-Felidj M., Bouazza M., Ferouani T., 2010.** - Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoides pussila (verticillata)* dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale). *Rev, Geo-Eco-Trop.*, 2010, 34

### -G-

**-Guignard, J.L.(2001).** Botanique Systématique moléculaire. 12<sup>ème</sup> Ed, Masson. 206-209.

**-Garcia-Lor A., Curk F., Snoussi-Trifa H., Morillon R., Ancillo G., Luro F., Navarro L., et Ollitrault P., 2013.** A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the 'true citrus fruit trees' group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. *Annals of Botany* **111**. 19p.

**-Guinochet M. et Vilmorin R.(1975) .** Flore de France fascicules. Ed. centre national de la recherche scientifique France.

**-Gugnard, j.L.** «Biochimie végétale», Masson, paris, 2000, pp166(1120155)

Sallé, J.L. «les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie», Edition Frison-Roche, Paris, 1991, 21.

### -H-

**- Harley I. M., Richard S. B., Smith V.E, Deborah W., Craig R. E (2006).** Citrus (citrus) and Fortunella (kumquat). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, p: 2-22.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**-Harley J.P., Klein D.A., Prescott L.M., Sherwood L.M., Willey J.M., Woolverton C.J. (2010).***Microbiologie*, Ed. De Boeck.

**-Hachemi F.Z., Hamzi N. (2018)** .Analyses physico-chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la plante *Ammoide verticillata* (nounkha) de la région de Tlemcen.Mémoire de fin d'étude .Université de Tlemcen.p:44.

### -I-

**-INRA de Rabat, (1968).**Les agrumes au Maroc. collection technique et production agricole,Maroc. pp. 409-424.

### -K-

**-Khajeh M., Yamini Y., Sefidkon F. et Bahramifar N.( 2004).** Comparison of essential oil comparison of *Carum Copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food chemistry*, 86 : 587 :591.

**-Kambouche N. et El-Abed D.( 2003 )**Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Trachyspermum ammi* (L.)Spargue from Oran (Algeria). *J. of essential oil research*,15 :10-11.

**-Krishnaiah D., Sarbatly R. & Nithyanandam R. (2011).** A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89: 217-233.

**-Kebdani M. (2016.2017).** Identification des souches locales de *Bacillus thuringiensis* en vue d'une lutte biologique contre *Ceratitidis capitata* et autres pathogènes de l'oranger *Citrus sinensis*.thèse Doctorat.Université Aboubakr Belkaied.Tlemcen.p:08.

### -L-

**-Lawrence B.M5.(1980 )**. The existence of intraspecific differences in specific general in the labiateac family. Paper presented at VII international congress of essential oils (Cannes), p.118-123.

**-Lahlou.M,2004-Phytotherapy Research ,2004,18 ,435-448.**

**-LARDRY.J.M.,HABERKORN.V,2**Les huiles essentielles: principes d'utilisation. *Kinesither Rev* 2007;(61):18-23.

### -M-

**-Manner, H.I., Easton ,R.S.,Smith ,V.&Elevitch, C.R. (2005).** *Citrus species (Citrus)*, ver.1.1.In : C.R Elevitch (ED). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR)*, Holualoa, Hawaii. pp. 31.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

-**ManzaneroMajil, V. (2004).** *Citrus Tristeza virus* (CTV): its development in Belize. *Caraphin New*, 24. pp. 1-4.

-**Mazih A., S. Eltazi, I. Srairi, L. Abaha, S. Sahil, H. Bouguiri, M. Miloudi, Y. Moubaraki, Y. Bourachidi & T. El Mourhir. 2007.** Field experiments towards the development of and strategy for the control of the MedFly (*Ceratitis capitata*) using ADRESS (SyngentaAgro) in Citrus orchards. IOBC/wprs . Working Group Integrated Control in Citrus Fruit Crops, meeting Catania (Italy), 5-7 November, 2007.

-**Madi A. (2010) :** caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Saugé) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Thèse de magister. université de Mentouri Constantine.

-**Majinda R.R.T., Abegaz B.M., Bezabih M. et autres (2001)** Resent resultants from naturel product resarch at the university of Botswana, Pure. Appl. Chem. 73 (7) : 1197-1208.

-**Millago H., Guisson IP., Naculma O. & Traore A.S. (2005).** Savoir traditionnel et médicament traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre centre européen de santé humanitaire ; Lyon.

-**Miguel M.G., Cruz C., Faleiro L., Simoes M.F.F., Figueiredo A.C., Barroso J.G. & Pedro L.G., (2010).** *Foeniculum vulgare*: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat. Prod. Commun.*, 5: 319-328.

### -O-

- **Ollitrault1 P., Terol J., Garcia-Lor A., Bérard A., Chauveau A., Froelicher Y., Belzile C., Morillon R., Navarro L., Brunel D., et Talon M., 2012.** SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *BMC Genomics*. 19p. Article de recherche.

### -P-

-**Padrini,F., Lucheroni M. T. (1996).** Le grand livre des huiles essentielles – guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies. Edition De Vecchi, Paris. 11, 15, 61 et 111.*de fin d'études ISTOM 2013 – Julie NICOLAS – Promotion 99 15P.*

### -Q-

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**-Quezel P. et Santa S.(1963)** . Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed centre national de la recherche scientifique. 663 p.

### -R-

**-Rai M. K., Acharya D. AND Wadegaonkar P. (2003)** - Plant derived antimycotics: Potential of *Asteraceous* plants, in: Plant- derived antimycotics: Current Trends and Future prospects. Haworth press, N-York, London, Oxford, pp: 165-185.

**-Roux R.(2008)** :conseil en aromathérapie.2eme Edition,pro-officia.,p.187.Iheir main components upon *Cryptococcus neoformans* .*Mycopathologia*.128 :p.151-153.

**-Richard S.(2007)**. Steele-Moore L., Goodwin A.C., Antimicrobial susceptibility testing protocols Ed. Goodwin Boca Raton: CRC Press, pp.77.

### -S-

**-Swingle W.T.**, 1943. The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. The Citrus Industry, 1. 415p.

**-Seu-Saberno,M. ;Blakeway,J,1984** «la mouse de chene,une base de la parfumerie»,pour la science,Edition Francaise de Scientific American,Mai,83.

**-Samate Aboul D.(2001)** :composition chimique d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso :Valorisation,thèse de doctoret,Univ de Ouagadougou, Burkina Faso.

### -T-

**-Tabti L. 2015** : Comparaison des activités insecticide et antimicrobienne de *Thymus capitatus*(L.) Hoffm. & Link, *Tetraclinisarticulata* (Vahl.)Masters et *Daucus crinitus*Desf. contre les pathogènes de l'oranger *Citrus sinensis* dans la région de Tlemcen. Thèse de Doct. Ecologie et envir. Uni.Tlemcen, 144p.

**-Tayoub G., Schwob I., Masotti V., Rabier J., Ruzzier M., Viano J. (2006)** – Contribution de la microscopie électronique à balayage et photonique à la connaissance de l'anatomie et de la morphologie de *Styrax officinalis* L. C. R. Biologies., 329(9): 712-718.

**-Teuscher E., Anton R. & Lobstein A. (2005)**. plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc editions, Paris.

**-Telphon T.** ABC des huiles essentielles. Éditions Grancher, 2003. 358 pages.

### -V-

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**-Valnet J .** Aromathérapie : traitement des maladies par les essences de plantes. Éditions Maloine. 545 pages,1984.

**-W-**

**-Werner M.** Les huiles essentielles : réveil du corps et de l'esprit. Éditions Vigot, collection Santé Bien-être, 95 pages, 2002.

**-Y-**

**Yahyaoui N. (2005)** - Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de *Mentha Spicata (L.)* sur *Rhyzopertha dominica (F.) (Coleoptera, Bostrychidae)* et *Tribolium confusum (Duv.) (Coleoptera, Tenebrionidae)*. Thèse de Magister en sciences.  
agronomiques, option Ecologie, INA, El-Harrach.

### Sites Internet

- ISO 9235:2013 (fr) - Matières premières aromatiques naturelles - Vocabulaire [Internet] ,Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:red-2:v1>:
- Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles -ANSM- [Internet]. [cité 2 oct 2017]. Disponible sur:[http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/657257784ff10b16654e1ac94b60e3fb.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/657257784ff10b16654e1ac94b60e3fb.pdf)
- <https://www.google.com/maps>.